



UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE

Departamento de Fisiología, Anatomía y Biología Celular

División de Neurociencias

María de la Luz Morales Botello

FISIOLOGÍA TÁLAMO-CORTICAL EN RESPUESTA A ESTIMULACIÓN SOMATOSENSORIAL DE LAS EXTREMIDADES EN RATA ANESTESIADA

Tesis dirigida por el Dr. Juan de los Reyes Aguilar y el Dr. Guglielmo Foffani

Toledo, 2015

D. Juan de los Reyes Aguilar Lepe y D. Guglielmo Foffani, Investigadores Principales del Laboratorio de Bioingeniería y Neurofisiología Experimental del Hospital Nacional de Paraplégicos

CERTIFICAN

Que el presente trabajo de investigación titulado: **“Fisiología tálamo-cortical en respuesta a estimulación somatosensorial de las extremidades en rata anestesiada”**, ha sido realizado bajo nuestra co-dirección y co-supervisión por la doctoranda Dña. María de la Luz Morales Botello, licenciada en Físicas por la Universidad Complutense de Madrid y con el Máster Oficial en Neurociencia y Biología del Comportamiento por la Universidad Pablo de Olavide de Sevilla.

Este trabajo reúne las condiciones de calidad y rigor científico para ser presentado y defendido como Tesis en opción al Grado Científico de Doctor.

Toledo, 13 de Octubre de 2015



Fdo: Dr. Juan de los Reyes Aguilar Lepe



Fdo: Dr. Guglielmo Foffani



Dña. Rocío Leal Campanario, Investigadora de la División de Neurociencias y Profesora del Departamento de Fisiología, Anatomía y Biología Celular de la Universidad Pablo de Olavide de Sevilla

CERTIFICA

Que el presente trabajo de investigación titulado: **“Fisiología tálamo-cortical en respuesta a estimulación somatosensorial de las extremidades en rata anestesiada”**, ha sido realizado bajo mi tutela por la doctoranda Dña. María de la Luz Morales Botello, licenciada en Física por la Universidad Complutense de Madrid y con el Máster Oficial en Neurociencia y Biología del Comportamiento por la Universidad Pablo de Olavide de Sevilla.

Este trabajo reúne las condiciones de calidad y rigor científico para ser presentado y defendido como Tesis en opción al Grado Científico de Doctor.

En Sevilla, 24 de Agosto de 2015

Fdo: Dr. Rocío Leal Campanario

A mi familia, a Javi, a Carla.

AGRADECIMIENTOS

Mis agradecimientos van en primer lugar a mis directores de tesis, Juan de los Reyes Aguilar y Guglielmo Foffani, responsables del grupo de Bioingeniería y Neurofisiología Experimental, del Hospital Nacional de Paraplégicos. Gracias Juan, por tu paciencia explicando y por tus grandes conocimientos que me hacían entender más fácilmente las cuestiones de este apasionante mundo de la neurociencia. Gracias por enseñarme a bajar un electrodo, a tener un buen registro, a analizar los experimentos y por muchas otras cosas. Pero sobre todo, gracias por facilitar que pueda, por fin, presentar esta tesis. La otra mitad de mis agradecimientos van para Guillermo, de ti también he aprendido muchísimas cosas, era realmente difícil seguirte, pero tus constantes ideas y tu entusiasmo, han hecho de mi tesis un buen trabajo y de mi, una mejor investigadora. A los dos, gracias.

A quienes fueran mis compañeras/os en el laboratorio de Bioingeniería y Neurofisiología Experimental del Hospital Nacional de Paraplégicos de Toledo (Elena, Josué, la otra Elena, Elisa, Francesca, Fernando e Irene), gracias por lo que hemos compartido tantos años. Hago extensible mi agradecimiento al resto de investigadores del Hospital, que con sus aportaciones fueron enriqueciendo mi visión de la ciencia y animando mi día a día en el hospital.

A mi tutora, Rocío Leal Campanario, profesora e investigadora en la Universidad Pablo de Olavide, que incluso de baja maternal, continúa su compromiso. Gracias Rocío, por tus minuciosas correcciones y aportaciones a mi tesis. Gracias por todo.

A Javier Márquez, profesor e investigador en la Universidad Pablo de Olavide, por tu interés, preocupación y ayuda.

A Jose María Delgado, profesor y director de la división de Neurociencias de la Universidad Pablo de Olavide de Sevilla, por su simpática visión de la neurociencia, por las charlas y sobre todo, gracias por abrirnos las puertas de tu casa a tus alumnos en aquellas barbacoas "científicas".

A aquellos que fueron mis compañeros del Máster de Neurociencia, españoles y sudamericanos en perfecta armonía, gracias por todo aquello que compartimos.

A Karen A. Moxon, profesora y directora asociada de School of Biomedical Engineering, Science and Health Systems, Drexel University. Gracias por tu cercanía y por tu interés para que realizase la estancia en Philadelphia, aunque finalmente, por motivos ajenos a nuestra voluntad, no pudiera ser.

A los seleccionadores del "FENS-IBRO Imaging Training Center: Imaging neural function, Laussane & Geneva, 2010", por incluirme entre los afortunados para participar en esa extraordinaria experiencia. A Carl Petersen, director del Laboratory of Sensory Processing, Brain Mind Institute, EPFL, Lausanne (Switzerland) por esa semana de acogimiento en el laboratorio. Gracias al resto de personas del laboratorio, que me permitieron participar en los experimentos in vivo con imagen VSD (eso me suena) y 2-photon, donde aprendí enormemente. Gracias también al profesor Egbert Welker, del Department of Cellular and Molecular Biology (DBCM), University of Lausanne, (Switzerland), por enseñarme de primera mano las claves para el análisis de microestructura mediante reconstrucción 3D con Microscopía Electrónica, me encantó. Agradezco también en este laboratorio a Aouatef Abaza, quien me enseñó muy amablemente y con todo detalle, su técnica para preparar rodajas.

A Xurxo Mariño, profesor del Departamento de Medicina de la Universidad de A Coruña, por tus relatos y charlas científicas, haces que la neurociencia sea mucho más apasionante de lo que ya es, eres necesario.

A Liset Menéndez de la Prida, responsable del Laboratorio de Circuitos Neuronales del CSIC, a Javier Cudeiro y Casto Rivadulla de la Universidad de A Coruña, porque después de tantas ocasiones en las que nos encontramos (congresos, cursos, master, visitas, etc.) erais casi de la familia. Gracias por todo lo que me habéis aportado.

A los jóvenes investigadores de Albacete, por organizar con esfuerzo y entusiasmo las jornadas científicas que nos reunían a los jóvenes investigadores, y sobre todo, gracias a los becarios solidarios, por abrir las puertas de vuestras casas a jóvenes científicos desconocidos.

A Manuel de Buenaga y Diego Gachet, de la Universidad Europea de Madrid, por la afectuosa acogida que me habéis dado. Gracias Manuel por tus sabios consejos sobre los agradecimientos, te ganaste un lugar aquí. Agradezco también a Fernando Aparicio, también profesor e ilusionado investigador de la Universidad Europea de Madrid, por tu constante preocupación por el estado de mi tesis.

Mi agradecimiento finalmente es para las personas que más cerca han estado de mí y que me han apoyado durante todo este tiempo. Gracias Mamá, por todo el esfuerzo que has hecho por mí, por tus consejos, por tu optimismo y sobre todo últimamente, gracias por echarme un cable haciéndome las comidas. Gracias hermanita, "Al", gracias por estar cerca y escucharme tantas veces a lo largo de estos años. Gracias también al resto de mis hermanos, Gema, Emi y Jorge. Finalmente, quiero agradecer a Javi, gracias por estar conmigo estos años, por ayudarme cuando yo no podía hacerlo, por darme fuerzas y por tener tanta paciencia. Y gracias como no a mi niña Carla, gracias por el tiempo que me prestaste para poder terminar esta tesis.

ABREVIATURAS UTILIZADAS

| | |
|------|---|
| CVB | Complejo ventrobasal talámico |
| VPL | Núcleo ventral-posterior-lateral talámico |
| VPM | Núcleo ventral-posterior-medial talámico |
| nTC | Neurona de proyección tálamo-cortical |
| NRT | Núcleo reticular talámico |
| S1 | Corteza somatosensorial primaria |
| S2 | Corteza somatosensorial secundaria |
| M1 | Corteza motora primaria |
| VSD | Voltage-sensitive dye (marcador sensible a voltaje) |
| CaSD | Calcium-sensitive dye (marcador sensible a calcio) |
| PSTH | Histograma de tiempo peri-estímulo |

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1. Sistema somatosensorial | 3 |
| 1.2. Tálamo | 6 |
| 1.2.1. Tálamo somatosensorial o complejo ventrobasal talámico (CVB) | 6 |
| 1.3. Corteza cerebral | 9 |
| 1.3.1. Corteza somatosensorial primaria | 11 |
| 1.4. Representación talamocortical de las vibrisas en rata | 12 |
| 1.5. Representación talamocortical de las extremidades en rata | 14 |
| 1.6. Código neural en tálamo y corteza (estudios computacionales) | 16 |
| 1.7. Imagen VSD para el estudio de la fisiología cortical <i>in vivo</i> | 18 |
| 1.7.1. Imagen VSD en la región cortical correspondiente a las vibrisas | 18 |
| 1.7.2. Imagen VSD en la región cortical correspondiente a las extremidades | 20 |
| 2. OBJETIVOS | 23 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS | 27 |

| | |
|--|----|
| 3.1. Sujetos experimentales | 29 |
| 3.2. Estudio fisiológico en tálamo somatosensorial | 29 |
| 3.2.1. Anestesia y estado cortical | 29 |
| 3.2.2. Procedimiento quirúrgico | 30 |
| 3.2.3. Registros electrofisiológicos | 31 |
| 3.2.4. Estimulación táctil | 32 |
| 3.2.5. Análisis de datos | 34 |
| 3.2.5.1. Análisis fisiológico | 35 |
| 3.2.5.1.1. Discriminación de neuronas individuales desde los registros electrofisiológicos | 35 |
| 3.2.5.1.2. Construcción de histogramas de tiempo peri-estímulo | 36 |
| 3.2.5.1.3. Medidas analizadas | 36 |
| 3.2.5.1.4. Análisis estadístico | 38 |
| 3.2.5.1.4.1. Respuestas ON y respuestas OFF en el complejo ventrobasal | 39 |
| 3.2.5.1.4.2. Comparación entre respuestas ON y respuestas OFF | 39 |
| 3.2.5.1.4.3. Respuestas ON-OFF y respuesta impulsiva | 39 |

| | |
|--|-----------|
| 3.2.5.1.4.4. Estructura espacial de las respuestas ON-OFF | 39 |
| 3.2.5.2. Análisis de información | 40 |
| 3.2.5.2.1. Información extraída de la magnitud de las respuestas | 41 |
| 3.2.5.2.2. Información extraída de la distribución temporal de las respuestas | 42 |
| 3.2.5.2.3. Información extraída de la magnitud de las respuestas, información extraída de la distribución temporal de las respuestas e información temporal | 44 |
| 3.2.5.2.4. Simulaciones con latencias y jitters . | 45 |
| 3.3. Estudio fisiológico en corteza somatosensorial | 47 |
| 3.3.1. Procedimiento quirúrgico | 47 |
| 3.3.2. Aplicación del VSD | 48 |
| 3.3.3. Técnica de imagen VSD (Voltage-Sensitive Dye) | 48 |
| 3.3.4. Registro de las respuestas VSD | 49 |
| 3.3.5. Estimulación eléctrica | 51 |
| 3.3.6. Análisis de datos | 51 |
| 3.3.6.1. Amplitud y latencia de las respuestas somatosensoriales corticales | 53 |

| | |
|---|---------------|
| 3.3.6.2. Extensión de las respuestas | |
| somatosensoriales corticales | 53 |
| 3.3.6.3. Direccionalidad de las respuestas | |
| somatosensoriales corticales | 55 |
| 3.3.6.4. Análisis estadístico | 56 |
| 4. RESULTADOS | 59 |
| 4.1. Estudio fisiológico en tálamo somatosensorial | 61 |
| 4.1.1. Análisis fisiológico | 61 |
| 4.1.1.1. Respuestas al estímulo ON | 61 |
| 4.1.1.2. Respuestas al estímulo OFF | 62 |
| 4.1.1.3. Índice de sintonía ON-OFF | 63 |
| 4.1.1.4. Comparación entre respuestas ON y respuestas OFF | 64 |
| 4.1.1.5. Respuestas al estímulo impulsivo | 65 |
| 4.1.1.6. Comparación entre respuestas impulsivas y respuestas ON-OFF | 66 |
| 4.1.1.7. Estructura espacial de las respuestas ON-OFF | 68 |
| 4.1.2. Análisis de información | 69 |
| 4.1.2.1. Información extraída de la distribución | |

| | |
|--|-----------|
| temporal de las respuestas | 69 |
| 4.1.2.2. Información extraída de la magnitud de las respuestas, información extraída de la distribución temporal de las respuestas e información temporal | 70 |
| 4.1.2.3. Primera espiga vs. segunda espiga de las respuestas | 76 |
| 4.1.2.4. Contribución de la latencia de las primeras espigas y de los jitters a la información | 77 |
| 4.1.2.5. Discriminación de estímulos vs. detección de estímulos | 79 |
| 4.2. Estudio fisiológico en corteza somatosensorial | 81 |
| 4.2.1. Imagen VSD de las respuestas somatosensoriales corticales | 81 |
| 4.2.2. Amplitudes y latencias de las respuestas VSD en corteza somatosensorial..... | 84 |
| 4.2.3. Extensión de las respuestas VSD en corteza somatosensorial | 88 |
| 4.2.4. Direccionalidad de las respuestas VSD en corteza somatosensorial | 91 |

| | |
|---|------------|
| 5. DISCUSIÓN | 95 |
| 5.1. Fisiología de las neuronas de los núcleos talámicos VPM | |
| y VPL | 97 |
| 5.2. Código neural en los núcleos talámicos VPM y VPL | 100 |
| 5.3. Imagen VSD de la región correspondiente a las | |
| extremidades en corteza sensorimotora | 103 |
| 6. CONCLUSIONES | 109 |
| 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 113 |
| 8. ANEXOS | 127 |
| Táctil responses of hindpaw, forepaw and whisker | |
| neurons in thalamic ventrobasal complex of | |
| anesthetized rat | 131 |
| Spike-timing, spike count and temporal information | |
| for the discrimination of tactile stimuli in the rat | |
| ventrobasal complex | 141 |
| Imaging the spatio-temporal dynamics of supragranular | |

| | |
|--|------------|
| activity in the rat somatosensory cortex in response to | |
| stimulation of the paws | 151 |

1. INTRODUCCIÓN

1.1. SISTEMA SOMATOSENSORIAL

El sistema somatosensorial recibe y procesa la información procedente de la superficie corporal u originada en estructuras profundas como órganos internos, huesos, articulaciones, etc. Dicho sistema procesa cuatro modalidades sensoriales básicas que vienen determinadas por los tipos de receptores sensoriales: mecanorrecepción (tacto), termorrecepción (temperatura), nocicepción (dolor) y propiocepción (posición del cuerpo). Los receptores detectan los estímulos, entonces, la información sensorial es transmitida al sistema nervioso central por medio de las neuronas aferentes, viajando a través de los distintos centros de relevo (médula espinal, tronco del encéfalo y tálamo) alcanzando, finalmente, la corteza cerebral.

Los receptores sensoriales son la terminal periférica de las llamadas neuronas sensoriales de primer orden. Los somas de dichas neuronas se localizan en los ganglios de las raíces dorsales y sus ramas centrales, denominadas aferentes primarias, se extienden hasta el asta dorsal de la médula espinal y hasta la región caudal del tronco del encéfalo, formando las columnas dorsales. Los distintos tipos de información sensorial son transmitidos por aferentes primarias con diferentes características. La información táctil y propioceptiva es transmitida por las fibras más gruesas y mejor mielinizadas (fibras $A\alpha$ y $A\beta$), que tienen una alta velocidad de conducción (70-120 m/s y 30-70 m/s, respectivamente). La información térmica y nociceptiva es transmitida por fibras menos gruesas y menos mielinizadas (fibras $A\delta$) y por fibras más finas sin mielina (fibras C), que presentan menor velocidad de conducción (12-30 m/s y 0.5-2 m/s, respectivamente). En las astas dorsales de médula espinal, como en los otros centros de relevo, encontramos interneuronas y neuronas de proyección, estas últimas transmiten la información sensorial a otros centros de relevo.

Las vías ascendentes que transmiten la información sensorial hacia centros superiores pueden dividirse en dos: vía anterolateral y vía lemniscal. La vía anterolateral engloba tres tractos ascendentes: espinorreticular, espinomesencefálico y espinotalámico. La información de dolor y temperatura que finalmente alcanza la corteza asciende por el tracto espinotalámico.

Mientras que los dos primeros llevan información que alcanza otras estructuras reguladoras del cerebro. La información de tacto y propiocepción asciende principalmente por la vía lemniscal. El tracto espinotalámico se origina en las neuronas de proyección de las astas dorsales de la médula espinal (láminas I, V, VII y VIII), donde se reciben las señales desde las aferentes primarias. El 90 % de los axones de estas neuronas de proyección cruzan la línea media a nivel medular, se sitúan anterolateralmente y ascienden hacia el tálamo somatosensorial contralateral, alcanzando principalmente el complejo ventrobasal aunque también núcleos intralaminares y mediales del tálamo. Desde aquí, las neuronas talámicas de proyección alcanzan la corteza somatosensorial primaria. La vía lemniscal tiene origen en las neuronas de los ganglios de las raíces dorsales, el axón entra en la médula espinal, se dispone dorsal y medial formando las columnas dorsales, deja una colateral en las astas dorsales de la médula espinal, y asciende hasta alcanzar en el tronco del encéfalo los núcleos de las columnas dorsales (núcleos gracilis y cuneatus). En los núcleos de las columnas dorsales, los axones de las neuronas de proyección cruzan la línea media, formando el lemnisco medial, el cual asciende hacia el complejo ventrobasal del tálamo, alcanzando posteriormente la corteza somatosensorial primaria. La figura 1.1 muestra un diagrama general de las principales vías ascendentes del sistema somatosensorial.

Cada neurona a lo largo de las vías tiene asociado un campo receptor, que se define como la región corporal o de otros tejidos, cuya estimulación produce una respuesta en dicha neurona. Los campos receptores crecen en complejidad a medida que la información sensorial asciende hacia la corteza, debido a que crecen en número y complejidad las conexiones neuronales. En cada estructura de la vía el procesamiento interno depende de: 1, las neuronas de proyección que además dejan colaterales en su propia estructura; 2, las neuronas inhibitorias locales o interneuronas; 3, las entradas de información de la vía principal; 4, la modulación procedente de vías descendentes o sistemas neuromoduladores. Todo ello hace que sucedan procesos de convergencia (cada neurona recibe entradas de varias neuronas) o divergencia (cada neurona conecta con varias neuronas) de la información somatosensorial.

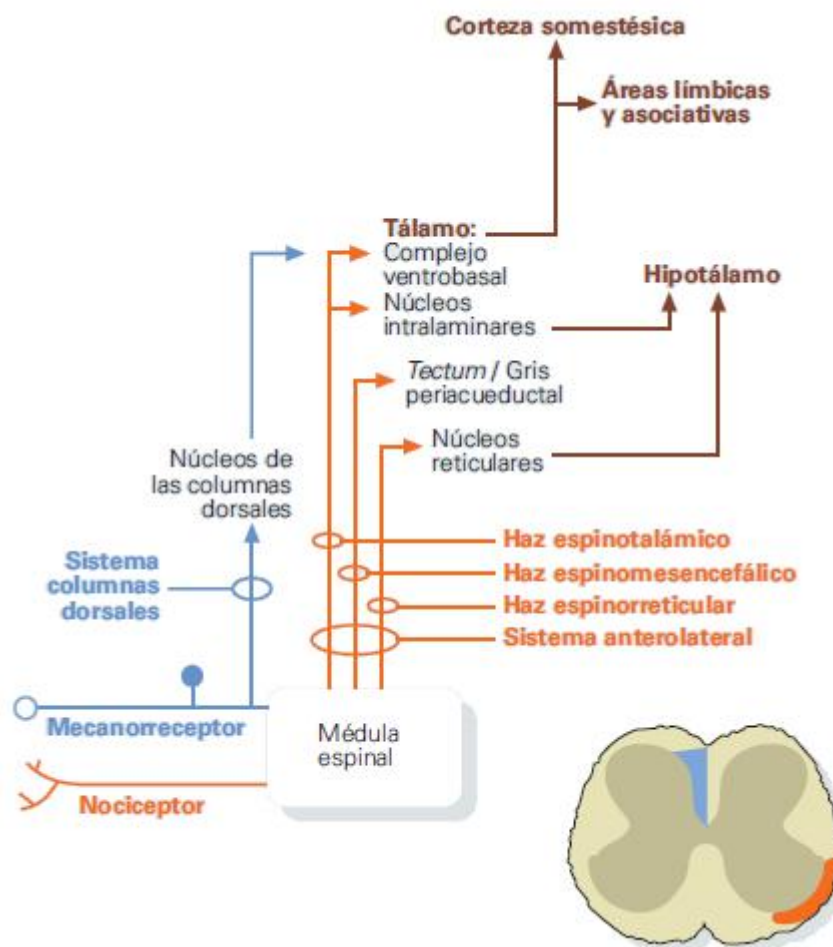


Figura 1.1. Diagrama general de las principales vías ascendentes en el sistema somatosensorial. En azul, el sistema lemniscal o de las columnas dorsales y en rojo, el sistema anterolateral. En un corte de la médula espinal se muestran las áreas aproximadas de ascensión de cada vía (Delgado et al., 1998)

Para el correcto funcionamiento del sistema somatosensorial, es crucial una organización espacial, es decir, una organización somatotópica, puesto que es necesario que las señales procedentes de cualquier punto de la superficie corporal puedan ser identificadas espacialmente para ser procesadas correctamente. Por ello, el sistema está organizado topográficamente, es decir, en cada nivel del sistema somatosensorial hay una correspondencia punto a punto entre regiones neuronales de dicho sistema y la superficie corporal, o dicho de otro modo, el conjunto de la superficie corporal es una disposición ordenada de campos receptores de neuronas del sistema

somatosensorial. A esta organización topográfica se le denomina 'somatotopía' y coexiste con una convergencia y divergencia en las vías somatosensoriales que garantizan en conjunto el correcto funcionamiento del sistema somatosensorial.

1.2. TÁLAMO

Clásicamente, el tálamo, ha sido considerado como una mera estación de relevo de la información sensorial hacia la corteza, puesto que en esta trayectoria todas las vías sensoriales, excepto la olfativa, pasan por tálamo. Sin embargo, ahora sabemos que el papel del tálamo está lejos de ser una simple estación de relevo. Además de las funciones sensoriales, el tálamo está implicado en numerosas funciones superiores como la atención, lenguaje, memoria y funciones ejecutivas además de en el análisis e integración de funciones motoras (Perea-Bartolomé & Ladera-Fernández , 2004).

1.2.1. Tálamo somatosensorial o complejo ventrobasal talámico (CVB)

El complejo ventrobasal talámico (CVB) o tálamo somatosensorial está compuesto por el núcleo ventral-posterior-lateral (VPL) y el núcleo ventral-posterior-medial (VPM) (Figura 1.2). El núcleo VPL recibe la información somatosensorial procedente del tronco y las extremidades y el núcleo VPM recibe la información somatosensorial procedente de la cara y parte de la cabeza (Wall & Dubner, 1972; Welker, 1973).

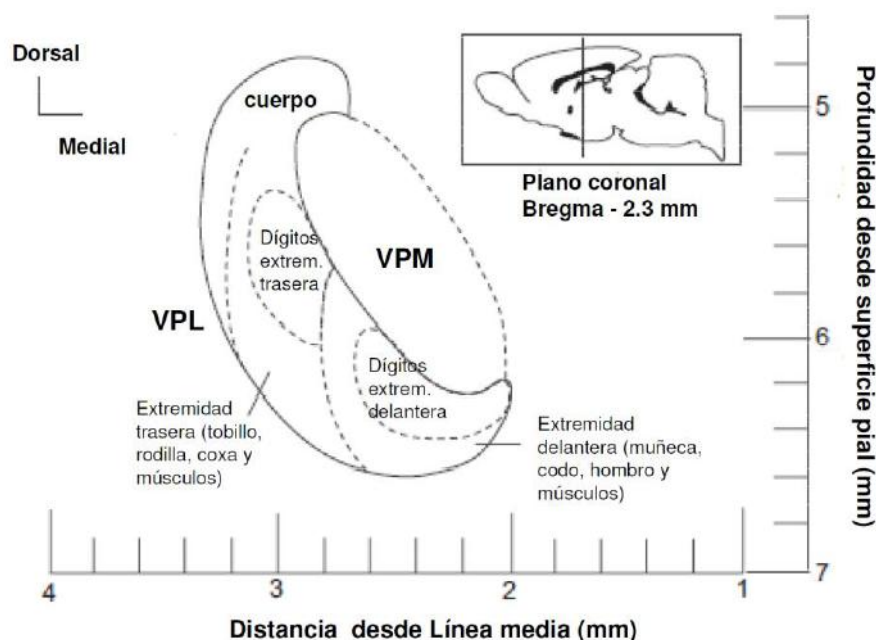


Figura 1.2. Esquema representativo de la somatotopía de un plano coronal del núcleo VPL y VPM (Bregma -2.3). En la parte superior derecha se muestra la posición del plano en relación al cerebro completo de la rata (Francis et al., 2008)

La información de tacto y propiocepción procedentes de la superficie corporal alcanza al CVB a través del lemnisco medial, el cual está compuesto por los axones procedentes de las neuronas de los núcleos de las columnas dorsales (información procedente del tronco y las extremidades) y por los axones de neuronas del núcleo principal del trigémino (información procedente de la cara y parte de la cabeza). Así, los axones que ascienden desde los núcleos de las columnas dorsales alcanzan el VPL, mientras que los axones que ascienden desde el núcleo principal llegan hasta el VPM. Por otro lado, la información térmica y nociceptiva procedente del tronco y extremidades alcanza el VPL a través del tracto espinotalámico, cuyo origen son las neuronas de proyección de las astas dorsales de la médula espinal y la información térmica y nociceptiva procedente de la cara y parte de la cabeza alcanza el VPM a través del tracto trigeminotalámico, cuyo origen son neuronas de los núcleos del complejo espinal del trigémino.

Es importante aclarar que dicha vía ascendente de información térmica y nociceptiva (tractos espinotalámico y trigeminotalámico o vía paralemniscal) no

tiene como principal blanco al CVB. Si bien la mayoría de los axones de la vía lemniscal alcanza dicho CVB, la vía paralemniscal tiene como principal objetivo talámico el núcleo posteromedial (Pom) y en menor medida el CVB y núcleos intralaminares y mediales del tálamo. Fibras gruesas originadas en núcleos del complejo espinal del trigémino proyectan al núcleo talámico posterior (Po), mientras fibras finas proyectan al VPM en forma de pequeñas y densas arborizaciones (Veinante et al., 2000).

El CVB está constituido por neuronas de proyección tálamo-corticales (nTC). Y a diferencia de otros centros de relevo, el CVB de la rata no posee interneuronas inhibitorias (*Barbaresi et al., 1986*), únicamente neuronas de proyección. En roedores, las neuronas de proyección en el VPM están distribuidas en forma de agregados denominados "barriloides". Cada barriloide se corresponde con una vibrisa y recibe la información sensorial procedente de la misma, de forma que en el VPM encontramos un mapa de agregados neuronales en correspondencia idéntica con el mapa de vibrisas del roedor. Cada barriloide del VPM recibe entradas de la vía lemniscal y paralemniscal, lo que permite la convergencia de información táctil y nociceptiva. Esta disposición cercana de la información táctil y nociceptiva está relacionada con los mecanismos de discriminación del dolor (Purves et al., 2001). Asimismo, las nTC del VPL se organizan en forma de agregados, los cuales se corresponden somatotópicamente con las diferentes regiones de la superficie corporal del tronco y las extremidades, y reciben información táctil y nociceptiva (Francis et al., 2008).

Las nTC del CVB proyectan somatotópicamente a neuronas de la capa IV de la corteza somatosensorial primaria, y dejan una colateral en la parte superior de la capa VI. Estas nTC en su camino de proyección a corteza, dejan a su vez, una colateral en las neuronas del núcleo reticular talámico (NRT). A su vez, la capa VI envía proyecciones recíprocas a las nTC, dejando una colateral en el NRT. Este núcleo es una fina capa de células gabaérgicas (inhibidoras) adyacente al tálamo que envía axones somatotópicamente a su correspondiente región en el CVB. Dichos axones constituyen la única entrada

inhibitoria de las nTC. Por lo tanto, el NRT contribuye al proceso de selección de señales que pasarán desde las neuronas TC a la corteza cerebral.

La conectividad talámica con la corteza somatosensorial, influenciada a su vez por la acción del NRT, sugieren que tálamo no es una simple estación de relevo de información entre los centros aferentes y la corteza, sino que es el encargado del procesamiento de la información e influye por tanto sobre las funciones corticales (Perea-Bartolomé & Ladera-Fernández, 2004).

1.3. CORTEZA CEREBRAL

Es una estructura extensa que cubre los hemisferios y alcanza mayor desarrollo en mamíferos. Se puede dividir en diferentes partes atendiendo al desarrollo filogenético y estructural: i) Isocórtex; ii) Paleocórtex; iii) Arquicórtex (Delgado et al., 1998).

La parte correspondiente a Isocórtex o Neocórtex abarca toda la superficie de los hemisferios, está compuesta fundamentalmente por estratos de neuronas, constituyen la sustancia gris, que se limita dorsal o superficial por la duramadre y tiene el límite ventral en la sustancia blanca. El neocórtex está organizado de forma laminar y se divide anatómica y funcionalmente en seis capas o láminas: **capa I** o capa molecular (también conocida como capa plexiforme externa), con células horizontales de Cajal y pocas interneuronas; **capa II** o capa granular externa, con células granulares o estrelladas; **capa III** o capa piramidal externa, con células piramidales pequeñas y medianas; **capa IV** o capa granular interna, con células granulares o estrelladas; **capa V** o capa piramidal interna, con células piramidales medianas y grandes y; **capa VI** o capa multiforme, con células de diversa morfología como las células fusiformes y células de Martinotti (Valverde, 2002; Delgado et al., 1998).

El isocortex tiene asociada una determinada región para cada modalidad sensorial (somatosensorial, visual y acústica), cada una de estas regiones se conocen como área sensorial primaria. Además de las áreas sensoriales primarias el isocortex contiene áreas motoras, áreas sensoriales secundarias y áreas de asociación. Las cuales, en conjunto, permiten la elaboración de

complejas respuestas de aprendizaje, memoria y comportamiento (Valverde, 2002).

Las aferencias del isocortex tienen origen en centros o estructuras subcorticales y en la propia corteza. Así, las áreas sensoriales primarias reciben las denominadas "fibras aferentes específicas" procedentes de los correspondientes órganos sensoriales a través de los núcleos talámicos específicos. Además de estas aferencias, el isocortex recibe aferencias de otros núcleos talámicos y de otros centros subcorticales. Las aferencias corticales procedentes de la propia corteza pueden originarse dentro del mismo hemisferio mediante las denominadas "fibras de asociación" o bien pueden proceder del hemisferio opuesto a través de las "fibras comisurales o callosales".

Las fibras aferentes de asociación corticocorticales y callosales se originan en las neuronas piramidales de la capa III y terminan prácticamente en todas las áreas y capas corticales, aunque especialmente en capas II y III. Las capas I y VI son el destino principal de las fibras corticocorticales. Las fibras de proyección subcortical de carácter tanto sensorial como motor se originan en las neuronas piramidales de la capa V y las de proyección corticotálamicas se originan en las neuronas de proyección de la capa VI. Las fibras aferentes específicas procedentes de tálamo finalizan en la capa IV. Además de estas fibras, la corteza recibe fibras inespecíficas y de distribución más difusa procedentes de los núcleos inespecíficos talámicos y de los sistemas aminérgicos y colinérgicos ascendentes (Delgado et al., 1998).

Cada una de las capas corticales tiene su propia individualidad, sin embargo, no son independientes, sino que puede hablarse de una organización funcional de grupos celulares verticalmente ensamblados en torno a un eje central representado por fibras aferentes corticales (Valverde, 2002). Se ha demostrado que esta organización modular o columnar no es exclusiva de las áreas sensoriales primarias, ya que las proyecciones corticocorticales se distribuyen también en bandas orientadas verticalmente y separadas de las bandas correspondientes a las fibras aferentes talamocorticales (Wise & Jones, 1976; Záborszky & Wolff, 1982).

1.3.1 Corteza somatosensorial primaria

Es la región del neocórtex que recibe la información sensorial referente a las modalidades de tacto, propiocepción, temperatura y dolor. Recibe la información sensorial por los axones de las nTC del CVB de forma ordenada espacialmente, reflejando al igual que en el tálamo, una organización somatotópica. De tal manera que dentro de la corteza somatosensorial primaria (S1) existe un área específica que recibe desde el VPM toda la información de la cara y parte de la cabeza, localizada más lateral en un corte coronal del cerebro. Mientras que la región más medial de la S1 recibe las entradas talámicas del VPL con información de las extremidades superiores (adyacente a la región de la cara pero más medial). El tronco y finalmente las extremidades inferiores tienen una localización medial (Figura 1.3).

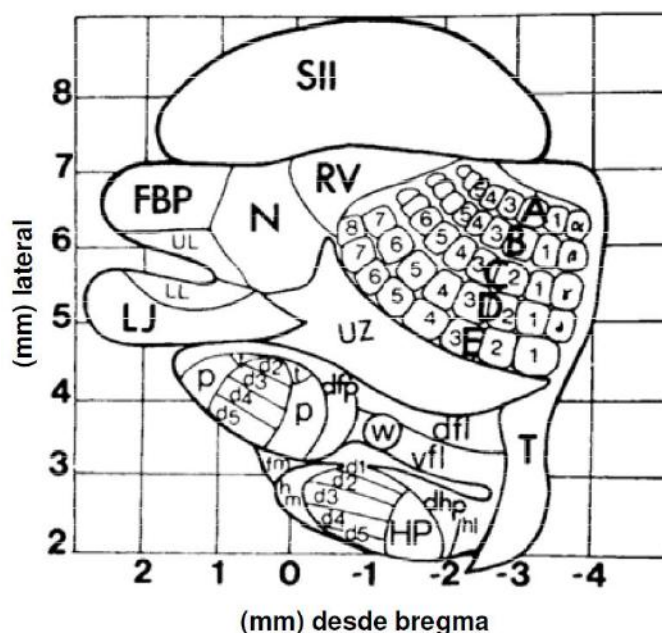


Figura 1.3. Mapa de la representación cutánea en S1 de la rata anestesiada. De Caudal a rostral: T, tronco; hl, extremidad trasera; HP, garra trasera; dhp, garra trasera dorsal; d1-5, dígitos de la garra trasera; hm, músculo de la extremidad trasera; vfl, extremidad delantera ventral; dfl, extremidad delantera dorsal; w, vibras de la muñeca; dfp, garra delantera dorsal; p, palma; d2-5, dígitos de la garra delantera; t, pulgar; UZ, zona sin respuesta en registros bajo anestesia; A-E, filas (dorsal a ventral) y números (de caudal a rostral) de las vibras del labio superior; RV, pequeñas vibras rostrales; N, hocico; UL, labio superior; LL, labioinferior; LJ, mandibula inferior (Chapin & Lin,1984).

Los estudios electrofisiológicos en humanos ya revelaron la organización somatotópica (Penfield & Rasmussen, 1950), esta organización se ha confirmado en todas las especies de mamíferos y concretamente en roedores ha sido muy estudiada y también en otras especies como el mapache (Rasmusson et al., 1992; Iwamura, 2009). En roedores se ha enfocado el estudio en el sistema trigeminal, es decir, la región de la cara y en particular de las vibrisas (Ghazanfar & Nicolelis, 1999; Ferezou et al., 2007). Sin embargo, hay pocos trabajos referentes a las regiones corporales del tronco y las extremidades (Chapin and Lin, 1984; Moxon et al., 2008; Ghosh et al., 2009).

Coexistiendo con una organización somatotópica existe una organización columnar, en la cual toda la superficie corporal (campos receptores) queda representada en columnas corticales. En roedores esta representación es especialmente clara en la región de las vibrisas, donde cada columna cortical (barril) se corresponde con una vibrisa del animal. De la misma forma que se ha descrito en el CVB del tálamo, en la corteza somatosensorial existen agregados celulares en la capa IV que toman forma de barril (en el caso de la región correspondiente a las vibrisas). Esta organización espacial se extiende verticalmente por las diferentes capas corticales formando las denominadas columnas corticales. Así las columnas corticales definen campos receptores y forman la base anatómica de la somatotopía general. La organización en barriles que definen columnas en correspondencia con cada vibrisa es una característica que la hace especialmente "sencilla" para el estudio de la fisiología somatosensorial, de ahí que las regiones correspondientes a las extremidades hayan recibido una menor atención. Aunque hay trabajos como los de Chapin and Lin (1984) que muestran la somatotopía cortical completa y remarcan la importancia de las extremidades en el mapa.

1.4. REPRESENTACIÓN TALAMOCORTICAL DE LAS VIBRISAS EN RATA

La representación talamocortical de las vibrisas en rata ha sido ampliamente investigada mediante estudios electrofisiológicos. Dichos estudios

han permitido determinar tanto el comportamiento individual de neuronas (actividad unitaria) como el comportamiento colectivo (actividad de campo).

Como se describe anteriormente, a nivel talámico existen en el VPM agregados neuronales denominados barriloides (Van der Loos, 1976). Estos barriloides están en correspondencia anatómica con el mapa de vibrisas de la rata, de forma que a cada vibrisa le corresponde un barriloide en VPM. Registros electrofisiológicos han mostrado que las neuronas pertenecientes a un barriloide responden con mayor magnitud y menor latencia cuando se estimula su vibrisa correspondiente (Welker, 1971; Brecht et al., 2003). Sin embargo, el campo receptor principal de las neuronas de un barriloide no queda determinado únicamente por una vibrisa, sino que depende del ángulo o dirección de deflexión de la misma. Así el campo receptor principal de estas neuronas puede definirse como una determinada vibrisa estimulada con un determinado ángulo (Timofeeva et al., 2003). Esta preferencia angular de las neuronas de un barriloide está asociada también con la localización de la neurona dentro del barriloide (Timofeeva et al., 2003). Las neuronas de un barriloide pueden responder también, aunque con menor magnitud y mayor latencia, a la estimulación de su vibrisa con otros ángulos y a la estimulación en vibrisas adyacentes, correspondiendo estos a campos receptores secundarios (Pinto et al., 2000; Timofeeva et al., 2003).

Esta organización somatotópica talámica se mantiene en corteza debido a que la mayoría de las neuronas de un barriloide talámico proyectan a su correspondiente barril cortical (Land et al., 1995). De esta forma las neuronas que responden a una sola vibrisa se encuentran en los barriles corticales. Pero existen neuronas que responden a la estimulación de 2 o más vibrisas, estas neuronas se encuentran principalmente en las regiones entre barriles (septa), dando lugar a regiones de solapamiento en la representación de vibrisas, que integra información de múltiples vibrisas (Armstrong-James 1987; Armstrong-James et al., 1992). Se ha encontrado que el tamaño de las áreas de las regiones que representan exclusivamente a una vibrisa son homogéneas a lo largo de todo el campo de vibrisas, sin embargo, no ocurre lo mismo en las regiones de solapamiento en la representación de vibrisas, siendo mayores las

áreas de representación multivibrisa en las filas ventrales (Guic et al., 2008). Existe también una organización anisotrópica que facilita la integración de entradas desde vibrisas de la misma fila, organización que se mantiene en las proyecciones de S1 a corteza motora primaria (M1) y corteza somatosensorial secundaria (S2) (Hoffer et al., 2003). Coexistiendo con esta anisotropía anatómica, registros electrofisiológicos han mostrado que la estimulación de una vibrisa desencadena la activación supraumbral y subumbral de regiones bastante alejadas del origen de la activación, independientemente de la vibrisa o capa cortical (Frostig et al., 2008). Puede decirse que a nivel cortical existen campos receptores muy amplios (Moxon et al., 2008; Brecht et al., 2003), sin embargo, el tamaño del campo receptor no es fijo, sino que es dependiente del estado, decreciendo a niveles mayores de anestesia y siendo máximos en el animal despierto activo (Armstrong-James and Callahan, 1991; Chapin et al., 1981; Armstrong-James and George, 1988a). Esto es, la información que llega desde la periferia y por tanto su procesamiento, depende del estado cortical.

1.5. REPRESENTACIÓN TALAMOCORTICAL DE LAS EXTREMIDADES EN RATA

Si bien la representación talamocortical en vibrisas ha sido y es objeto de numerosos estudios, algo muy diferente ocurre con la representación talamocortical de las extremidades, donde los estudios son escasos. La somatotopía talámica en el núcleo VPL es similar a la del núcleo VPM, es decir, existen agregados celulares en correspondencia con las diversas regiones corporales (Emmers, 1965). Dentro de esta somatotopía, se ha encontrado que la representación topográfica de las garras en las extremidades anterior y posterior es mucho mayor que la del resto de la extremidad (Francis et al., 2008), es decir, los campos receptores son mucho más pequeños en la parte distal de la extremidad y aumentan progresivamente hacia la parte proximal de la misma (Angel & Clarke, 1975). En el trabajo de Francis et al. también se describe que el VPL está dividido en tres regiones que procesan distinta modalidad sensorial. Los registros electrofisiológicos mostraron que la parte rostral del VPL lleva información propioceptiva; la parte medial lleva

información cutánea con un fino mapa topográfico de los miembros anterior y posterior; y la parte caudal del VPL podría representar el flujo de información nociceptiva. El tamaño del campo receptor varía en esas tres regiones, siendo difusos y amplios en las regiones rostral y caudal (por ejemplo varios dígitos, la palma entera o incluso la garra entera), mientras que la región medial se compone de células con campos receptores pequeños y focalizados (por ejemplo un solo dígito, un segmento de un dígito, un segmento de la palma, etc.).

A nivel cortical los registros electrofisiológicos han permitido hacer un mapeo de la corteza somatosensorial, que muestra que la representación de la extremidad delantera está organizada topográficamente mediante agregados celulares que forman estructuras similares a barriles (Waters et al., 1995), en las cuales cada agregado neuronal está asociado con una región discreta dentro de la extremidad, de forma similar a lo que ocurre en el sistema de vibrisas. Registros de neuronas individuales muestran que el tamaño del campo receptor varía según la capa cortical, siendo mínimos en capa IV y máximos en capa V (Haupt et al., 2004). Además en todas las capas existe un gradiente de tamaño de campo receptor en dirección rostro-caudal, donde los campos receptores más rostrales corresponden a los dígitos y los caudales corresponden a la parte proximal de la extremidad. Esto está en concordancia con la representación de las extremidades en el tálamo, donde también se encuentran campos receptores más pequeños a medida que nos acercamos a los dígitos de una extremidad. Como describíamos en la representación de las vibrisas, la representación cortical de las extremidades también depende del estado, y se caracteriza por campos receptores más pequeños a medida que se incrementan los niveles de anestesia. Sin embargo, a través de los diferentes estados, parte de la representación se mantiene relativamente invariante, el centro del campo receptor (Chapin & Lin, 1984). Esto puede ser interesante desde el punto de vista de la codificación neuronal.

1.6. CÓDIGO NEURAL EN TÁLAMO Y CORTEZA (estudios computacionales)

Las neuronas representan y transmiten la información mediante secuencias de potenciales de acción (espigas) en varios patrones temporales (Dayan & Abbott, 2001). Entender el código neural es conocer cómo mediante la secuencia de potenciales de acción las neuronas son capaces de representar las características de los estímulos. Así, antes de adentrarnos en aspectos más profundos del código neuronal en el sistema tálamo-cortical, es necesario conocer el tipo de actividad de las neuronas de dichas regiones.

Como mencionamos anteriormente, el tipo de actividad de las neuronas depende del estado. Las células talámicas pueden funcionar en dos modos de actividad. En el animal despierto activo las células disparan en modo tónico, mientras que cuando el animal está en reposo, somnoliento o anestesiado, las células disparan en forma de ráfagas de potenciales de acción (modo ráfagas o modo 'burst') (Swadlow & Gusev, 2001; Sherman, 2001). En modo tónico las células presentan una mayor actividad espontánea y mayor y más eficiente actividad en respuesta a estímulos (Sherman, 2001). Experimentos realizados en animales anestesiados a través de diferentes niveles de anestesia (ligera, intermedia y profunda) muestran la presencia de ráfagas espontáneas en todos los niveles, aunque al aumentar el nivel de anestesia se hacen más prominentes y rítmicos, decrece la frecuencia de las ráfagas y se dan menos espigas entre ráfagas, disminuyendo por tanto el ratio de actividad espontánea total (Erchova et al., 2002). En ambos modos puede transmitirse información pero con distinta calidad. Si bien, en el modo tónico la respuesta neuronal sigue mejor al estímulo, el modo ráfaga permite una mejor detección de la señal (Sherman, 2001). Asimismo, recientes estudios muestran que el modo ráfagas puede ser un modo efectivo de transmisión de información en animal despierto (Ortuño et al., 2014).

En el proceso de transmisión de información, el número de espigas por estímulo a nivel talámico (VPM) puede oscilar en función de las características del estímulo, así en Montemurro et al., (2007) este valor es inferior a una espiga por estímulo, en Hartings et al. (2000) varía entre 0.5 y 1.5, en Kyriazi et

al. (1994) entre 1 y 2 espigas por estímulo. Armstrong-James & Callahan (1991) reportan 1.08 espigas por estímulo en barriloides talámicos y 1.7 veces mayor el número de espigas por estímulo en su correspondiente barril cortical y en respuesta al mismo estímulo. En capas infragranulares, Tutunculer et al. (2006) muestran aproximadamente 1 espiga por estímulo tras estimulación del campo receptor principal.

Este relativamente bajo número de espigas en respuesta a los estímulos, sugiere que podría haber otros elementos de la respuesta neuronal más significativos en la transmisión de información acerca de las características de los estímulos. En la corteza somatosensorial correspondiente a las vibrisas, se ha demostrado que la información extraída de las respuestas es mayor si se consideran las características temporales de las mismas en lugar de considerar únicamente la magnitud de la respuesta (Panzeri et al. 2001; Foffani and Moxon, 2004). Los aspectos temporales de las respuestas también tienen gran relevancia en el VPM, dada la alta precisión de las respuestas de las neuronas de dicha región (Nicolelis & Chapin, 1994; Aguilar & Castro-Alamancos, 2005; Petersen et al., 2008). Una alta precisión en las respuestas de neuronas individuales es necesaria para una actividad poblacional sincronizada. Se sabe que la actividad sincrónica de neuronas de un barriloide talámico codifica no solo la velocidad de deflexión, sino también la localización y dirección de movimiento de las vibrisas (Temereanca & Simons, 2003). La actividad sincronizada talámica es importante además, para asegurar la transmisión de la información relevante en circuitos corticales locales (Temereanca et al., 2008). De esto se deduce que además de importar que respondan las neuronas del VPM, importa cuando responden. Asimismo, análisis de información en este núcleo han demostrado que los aspectos temporales de las respuestas generan más información que la magnitud de las mismas (Ghazanfar et al., 2000; Montemurro et al., 2007). Sin embargo, pese a su importancia, el papel que juegan los aspectos temporales son mucho más desconocidos en el núcleo VPL del tálamo.

1.7. IMAGEN VSD PARA EL ESTUDIO DE LA FISIOLÓGÍA CORTICAL *IN VIVO*

La técnica de imagen basada en marcadores ópticos fluorescentes sensibles a voltaje (Voltage-Sensitive Dye, VSD), ha supuesto en los últimos años una revolución en el estudio de la fisiología cortical *in vivo* (Grinvald & Hildesheim, 2004). El motivo es la excelente resolución espacial ($>50\text{ }\mu\text{m}$) y temporal ($>1\text{ ms}$) que proporciona, a diferencia de otras técnicas, las cuales pueden aportar excelente resolución espacial pero escasa resolución temporal y viceversa (Shoham et al., 1999). Físicamente, los marcadores se unen a las membranas neuronales y cambian su fluorescencia o absorbancia en respuesta y de forma proporcional, a cambios en el potencial de membrana (Cohen et al., 1974; Grinvald & Hildesheim, 2004; Tsytsarev et al., 2014). *In vivo*, la señal de los VSD procede de la actividad poblacional de capas supragranulares 2/3 principalmente (Petersen et al, 2003a; Grinvald & Hildesheim, 2004). En la corteza somatosensorial, esta técnica ha sido ampliamente utilizada, especialmente en la región correspondiente a las vibrisas. La utilización de esta técnica en la corteza somatosensorial *in vivo* la analizamos detalladamente en los siguientes subapartados.

1.7.1. Imagen VSD en la región cortical correspondiente a las vibrisas

Uno de los primeros trabajos en los que se aplican los VSD para el estudio de la fisiología de la corteza somatosensorial de la rata data de los años 80. Orbach et al. (1985) visualizan las capas superiores de la corteza de barriles en respuesta a estimulación de una única vibrisa y dos vibrisas separadas. Además, con el objetivo de utilizar la técnica de imagen para estudiar la disfunción cortical aplican bicuculina, un agente epileptogénico antagonista del GABA que actúa en los receptores tipo GABAA, lo que bloquea gran parte de la actividad inhibitoria en la corteza y por tanto, facilita la actividad epiléptica. De igual manera, London et al (1989) usan esta técnica para estudiar la influencia de un agente epileptogénico sobre la fisiología cortical, visualizando la corteza en respuesta a estimulación de una vibrisa antes y después de la aplicación de la bicuculina. A diferencia de Orbach et al.

(1985) usan el VSD RH795 en lugar del RH414, debido a que este último en concentraciones superiores a 0.1 mg/ml causaba constricción irreversible de las arterias en la superficie de la corteza. Kleinfeld & Delaney (1996) utilizan la técnica para estudiar las interacciones entre barriles vecinos, así como el patrón de respuesta a través de S1 y S2 por estimulación de una vibrisa. Esta técnica de imagen también es capaz de captar actividad espontánea, la característica actividad sincronizada "up-down" fue visualizada por Petersen et al. (2003b), mostrando despolarizaciones localizadas y propagación de ondas de despolarización, además, estudiaron la influencia del estado (actividad espontánea) en la respuesta neuronal, para lo cual utilizaron la técnica sobre animal anestesiado y sobre animal despierto. En este trabajo el VSD empleado fue RH1691, el cual comienza a utilizarse de forma generalizada hasta la actualidad, puesto que fue considerado óptimo para su uso *in vivo*. En otro trabajo, Petersen et al. (2003a) estudian la extensión de la señal VSD en función de la intensidad de estimulación. Además, combinan la técnica de imagen con registros intracelulares en células piramidales, visualizando la correlación entre ambas señales. La dinámica espaciotemporal de la integración sináptica en capas supragranulares fue estudiada por Civillico & Contreras (2006) con imagen VSD. La aplicabilidad de esta técnica de imagen se extiende hasta animales sin restricción de movimiento (Ferezou et al., 2006). En este trabajo, simultáneamente a la adquisición de la imagen VSD, filman el movimiento de las vibrisas. Analizan la respuesta cuando se estimula activa o pasivamente las vibrisas en distintos comportamientos (en reposo o "whisking") y en distintos estados (despierto o anestesiado). Los anteriores autores también aplican imagen VSD para estudiar el papel de la corteza motora en el procesamiento somatosensorial (Ferezou et al., 2007). La técnica de imagen VSD ha sido combinada con imagen de marcadores sensibles a calcio (CaSD) *in vivo* para estudiar la dinámica subumbral y supraumbral en corteza de barriles (Berger et al., 2007). La plasticidad de la corteza de barriles ha sido también objeto de estudio mediante imagen VSD (Wallace & Sakmann, 2008). En dicho trabajo visualizan los cambios en la dinámica espaciotemporal cortical tras privación sensorial en la etapa de desarrollo postnatal. La influencia del

estado (nivel de anestesia) sobre las respuestas en corteza de barriles sigue siendo objeto de estudio en los últimos años, como muestra el trabajo de Devonshire et al. en 2010. En ese mismo año, Tsytsarev et al. utilizan la técnica para visualizar la actividad neural en corteza de barriles en respuesta a deflexión de una vibrisa en diferentes direcciones.

Como puede observarse, la corteza somatosensorial correspondiente a los barriles en roedores ha sido empleada como modelo para el estudio de cuestiones sobre fisiología general y fisiología patológica utilizando la técnica de imagen basada en VSD.

1.7.2. Imagen VSD en la región cortical correspondiente a las extremidades

En general, la corteza somatosensorial correspondiente a las extremidades no ha sido utilizada frecuentemente para el estudio de fisiología en situación control sino más bien para el estudio de patologías y plasticidad cortical, empleando para ello técnicas de imagen como las basadas en VSD.

El trabajo de Ferezou et al. (2007) muestra una activación en corteza somatosensorial en respuesta a estimulación de la extremidad delantera, sin embargo el estudio de integración sensoriomotora está realizado en corteza de barriles. Brown et al. (2009) investigan en adulto los cambios en el mapa y en procesamiento de las señales sensoriales durante la recuperación tras infarto cerebral en la corteza somatosensorial correspondiente a la extremidad delantera. Para lo cual, realiza imagen *in vivo* de los cambios en potencial de membrana mediante imagen VSD combinado con imagen multifotón de la estructura dendrítica y conectividad neuronal. Esto es realizado antes de la lesión y a partir de una semana post-lesión. La influencia de un infarto en la corteza somatosensorial correspondiente a las extremidades es también abordada en el trabajo de Sigler et al (2009) mediante la técnica de imagen VSD. Aunque en este caso, se centran en los cambios ocurridos en las primeras horas tras la lesión. El objetivo de ese trabajo era analizar el posible cambio en la velocidad de redistribución cerebral a través de conexiones existentes antes de la lesión. Las cualidades espaciotemporales de la técnica

de imagen VSD han permitido avanzar en el estudio de los cambios corticales tras lesión medular. Ghosh et al. (2009) realizaron hemisección de la médula espinal en ratas adultas para explorar la representación y proyección cortico-espinal de la corteza intacta (ipsilesión) a doce semanas post-lesión. La técnica de imagen VSD también revela la dinámica espaciotemporal en respuesta a estimulación eléctrica de la extremidad delantera y trasera ipsilateral. Asimismo, Ghosh et al. (2010) usan la técnica de imagen VSD para estudiar en la corteza de la región de los miembros traseros, las neuronas cortico-espinales axotomizadas recableadas en la médula espinal cervical. La técnica de imagen VSD es empleada también por Lee et al. (2011) para mapear el patrón espaciotemporal de la respuesta a estimulación del nervio ciático en ratas control, en ratas a una semana y cuatro semanas post-lesión medular. La plasticidad cortical fue también estudiada por McVea et al. (2012). Concretamente, analizan la influencia de la actividad espontánea en la maduración de los circuitos cerebrales en el animal en desarrollo. Para ello, realizan imagen VSD de la actividad cortical tras contracciones espontáneas de la musculatura de la extremidad posterior y la cola.

2. OBJETIVOS

Conocer las claves de cómo los estímulos externos son procesados por el sistema somatosensorial es todavía hoy un importante objetivo en neurociencia. Un sistema que resulta particularmente conveniente para este estudio, por su simplicidad estructural, ha sido el sistema somatosensorial correspondiente a las vibrisas de roedores. En dicho sistema, cada vibrisa es representada por un agregado de neuronas formando un mapa somatotópico casi idéntico al mapa de vibrisas en el hocico del animal. Se han realizado numerosos estudios sobre cómo estos agregados responden a diversos tipos de estimulación de las vibrisas. Asimismo, se han estudiado las respuestas de neuronas individuales dentro de estos agregados y también activaciones más globales del mapa somatotópico de vibrisas a nivel cortical, definiendo claras relaciones entre los estímulos en vibrisas y las activaciones de sus correspondientes agregados en los diversos niveles del sistema somatosensorial (tronco, tálamo y corteza) contralateral. Para el humano, sin embargo, es primordial conocer la fisiología del sistema somatosensorial relativo a las extremidades, aunque paradójicamente encontramos que hay grandes lagunas de conocimiento en este campo. Por un lado, no está claro si la fisiología de las neuronas que representan a las extremidades es similar a la más conocida fisiología de las neuronas que representan a las vibrisas. Por otro lado, desde un punto de vista más global, están poco definidas cuestiones como el alcance y la dinámica de activación que un estímulo somatosensorial produce en la representación de las extremidades a lo largo del sistema somatosensorial. Asimismo, desde un punto de vista somatotópico, es bien conocido que cada región corporal está representada en el hemisferio contralateral. Se desconoce, sin embargo, si las regiones corticales ipsilaterales activadas por un estímulo periférico responden a un patrón somatotópico similar al obtenido en la región cortical contralateral.

Por todo ello, el **objetivo general** del presente trabajo consiste en ampliar el conocimiento actual sobre la fisiología del sistema somatosensorial en la representación de las extremidades. Este trabajo se realiza en dos niveles del sistema somatosensorial: 1) a nivel talámico, donde se realizará un estudio exhaustivo de la fisiología de neuronas individuales en la representación de las

extremidades y en la representación de las vibrisas; y 2) a nivel cortical, donde se realizará un detallado estudio de las activaciones corticales y los mapas que se obtienen en la corteza somatosensorial ante estímulos aplicados en las extremidades.

Para lograr el objetivo general de este trabajo, se plantearon los siguientes **objetivos específicos**:

1. Estudiar y comparar la respuesta de neuronas talámicas en la representación de las extremidades y en la representación de las vibrisas a partir de registros electrofisiológicos extracelulares en los núcleos ventral-posterior-lateral y ventral-posterior-medial del complejo ventrobasal talámico.
2. Analizar los aspectos temporales del código neural mediante análisis de información desde los registros electrofisiológicos obtenidos en los experimentos anteriores y la aplicación de experimentos computacionales.
3. Investigar la dinámica de activación espaciotemporal de las capas supragranulares de la corteza sensorimotora de un hemisferio en respuesta a estimulación de las extremidades contralaterales e ipsilaterales a dicho hemisferio mediante la técnica de imagen VSD.

La consecución de los objetivos planteados en el presente trabajo es de crucial importancia puesto que supondrá un gran avance en el conocimiento actual sobre el procesamiento del sistema somatosensorial relativo a las extremidades en condiciones fisiológicas. Este conocimiento podrá ser utilizado como base fisiológica para interpretar los fenómenos que suceden en el sistema somatosensorial cuando es afectado por un daño bien periférico, como amputaciones, o bien central, como el caso de la lesión medular o el accidente cerebro-vascular.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. SUJETOS EXPERIMENTALES

Todos los experimentos con animales se han realizado conforme con el "International Council for Laboratory Animal Science, European Union regulation 86/609/EEC" y fueron aprobados por el Comité de Ética para la Experimentación Animal del Hospital Nacional de Paraplégicos (Toledo, España). Los datos experimentales se obtuvieron de 13 ratas wistar macho de entre 250 y 350 g para los estudios fisiológicos en tálamo sensorial y de entre 280 y 410 g para los estudios fisiológicos en corteza somatosensorial.

3.2. ESTUDIO FISIOLÓGICO EN TÁLAMO SOMATOSENSORIAL

3.2.1. Anestesia y estado cortical

Los animales fueron anestesiados con pentobarbital (50 mg/Kg) o uretano (1.5 g/Kg) intraperitoneal. Estos anestésicos fueron elegidos por su uso bien establecido en el estudio de las propiedades de los campos receptores de las neuronas tálamo-corticales en la rata. Durante el transcurso del experimento, el nivel de anestesia se mantuvo constante en estado III-3 (Friedberg *et al.*, 1999) mediante la aplicación de dosis suplementarias (1/4 de la dosis original para ambos anestésicos) cuando eran requeridas.

El estado III-3 se caracteriza por una frecuencia predominante de 3-4 Hz en el electroencefalograma cortical (Figura 3.1, registro inferior). Esta frecuencia representa un estado menos sincronizado comparado con niveles de anestesia más profundos caracterizados por ráfagas o "bursts" rítmicos a frecuencias inferiores (Figura 3.1, registro superior). Si durante un protocolo de estimulación se detectaban ráfagas rítmicas, el protocolo se abortaba. El estado III-3 es un estado bastante estable en el cual las neuronas tálamo-corticales presentan campos receptores relativamente grandes (varias vibrisas o varios dígitos). A niveles de anestesia más profundos, las neuronas tálamo-corticales presentan campos receptores mínimos (por ejemplo, solo una vibrisa) y, por lo tanto, las respuestas neuronales pierden mucha de su complejidad spatiotemporal (Friedberg *et al.*, 1999). A niveles más ligeros de anestesia, los animales presentan movimientos espontáneos de las vibrisas, y

las neuronas tálamo-corticales aumentan el tamaño de su campo receptor y la complejidad espaciotemporal de sus respuestas (Friedberg *et al.*, 1999), lo cual es máximo en estados activados (Aguilar & Castro-Alamancos, 2005) y en animales despiertos (Nicolelis & Chapin, 1994). El estado III-3 ofrece, por tanto, una buena condición experimental para registrar consistentemente a través de largos protocolos de estimulación y para retener, al menos, parte de la complejidad espaciotemporal que caracteriza a las respuestas de las neuronas tálamo-corticales.

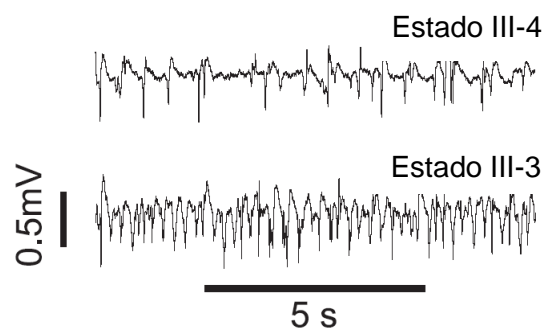


Figura 3.1. Influencia del nivel de anestesia en el estado cortical. Potenciales de campo corticales registrados en animal bajo anestesia profunda (estado III-4) y bajo anestesia más ligera (estado III-3).

3.2.2. Procedimiento quirúrgico

Una vez que la anestesia hizo efecto, los animales fueron colocados en el aparato estereotáxico (SR-6R; Narishige Scientific Instruments, Tokyo, Japan). Se aplicó lidocaína 2 % sobre la superficie corporal y sobre las zonas de incisión. Se retiró suavemente la piel de la parte superior del cráneo y se realizó una gran craneotomía en el lado derecho de la línea media (Antero-Posterior = 1:-4 y Medio-Lateral = 1:4, Atlas de Paxinos & Watson, 1986) para facilitar el acceso al tálamo. Se realizaron pequeñas incisiones en la duramadre para permitir el paso de los electrodos de registro al cerebro. Para preparar las vibrissas para la estimulación, éstas se cortaron a 1 cm de la piel. La temperatura de los animales se mantuvo constante a 36.5 ° C con una manta térmica controlada automáticamente.

3.2.3. Registros electrofisiológicos

Se realizaron registros extracelulares de neuronas individuales del tálamo de la rata. Para ello se emplearon electrodos de tungsteno de 4 M Ω de impedancia (TM31C40KT de WPI, Inc., Sarasota, FL, USA). Se insertó un electrodo adicional en la corteza somatosensorial para tener un registro continuo de las señales electroencefalográficas, las cuales se usaron para monitorizar el efecto de la anestesia (Figura 3.1).

Todos los registros fueron amplificados y filtrados usando un sistema modular compuesto por preamplificador (x100), filtro (1 a 3000 Hz) y amplificador (x5) (Neurolog; Digitimer Ltd). Las señales analógicas se convirtieron a digitales con una frecuencia de muestreo de 20000 Hz y cuantificación de 16-bits usando la tarjeta CED Power 1401 (Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK) controlada por el "software" Spike2 (v5.03; Cambridge Electronic Design). Las señales se almacenaron en el disco duro de un ordenador para los posteriores análisis.

Se obtuvieron registros de neuronas individuales en los núcleos VPM y VPL (Antero-Posterior = -2.3:4, Medio-Lateral = 2:4, Dorsal = 5:7) (Figura 3.2). Se registraron las respuestas a estimulación de vibrisas en neuronas del VPM y las respuestas a estimulación cutánea de las extremidades anteriores y posteriores en neuronas del VPL. El VPM está localizado dorsal y medial en el tálamo somatosensorial, y el VPL está localizado justo detrás, más ventral y lateral, haciendo una pequeña curva de medial a lateral alrededor de la base del VPM (Figura 3.2). De esta manera, al bajar el electrodo al tálamo somatosensorial, era posible aislar neuronas con campo receptor en las vibrisas, en la extremidad anterior y finalmente, en la extremidad posterior (Emmers, 1965; Waite, 1973a; Vahle-Hinz & Gottschaldt, 1983). En cada experimento se bajaba el electrodo una o dos veces y se registraba en varias profundidades (de una a tres) cada vez, dependiendo del tiempo requerido para aislar buenas neuronas y alcanzar las condiciones fisiológicas adecuadas. Una vez que una neurona era aislada, se identificaba la región corporal (vibrisa, extremidad anterior o extremidad posterior) donde un leve toque con un pincel producía una respuesta neuronal consistente.

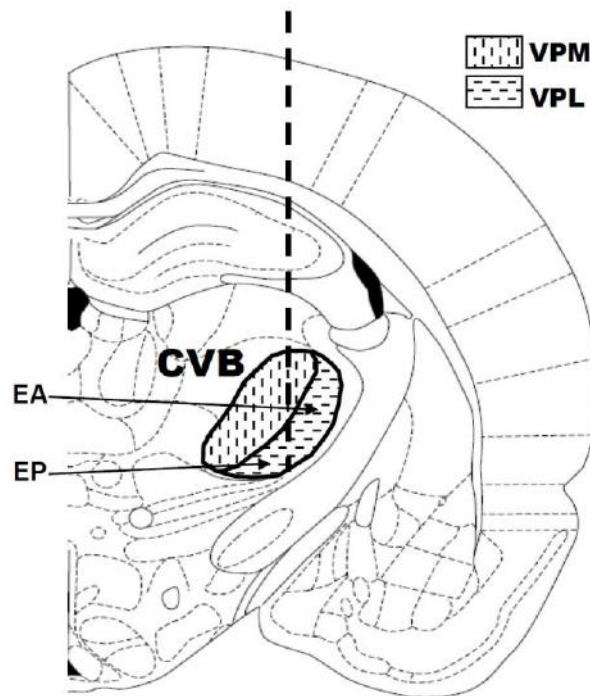


Figura 3.2. Diagrama de una sección coronal del hemisferio derecho a -3.14 mm de Bregma (modificado desde Paxinos & Watson (1986)). El complejo ventrobasal (VBC) está delimitado por una línea gruesa continua. El VBC está compuesto por el núcleo ventral-posterior-medial (VPM), que representa las vibrisas y el núcleo ventral-posterior-lateral (VPL), que representa el resto del cuerpo. La representación de la extremidad anterior (EA) está localizada en la porción dorsolateral del VPL, y la representación de la extremidad posterior (EP) está localizada en la porción ventromedial. La línea gruesa discontinua indica el camino recorrido por un electrodo atravesando el VPM y el VPL.

En la mayoría de los lugares de registro ($n = 24$ lugares) se consiguió aislar una sola neurona y en algunos fue posible aislar dos ($n = 7$ lugares) e incluso tres ($n = 1$ lugar) neuronas individuales. La relación señal ruido era siempre superior a 10 para la neurona principal (espiga de mayor amplitud del registro) y superior a 5 para las neuronas secundarias (Figura 3.3). La calidad de los registros de neuronas individuales se comprobó durante los experimentos para mantener la relación señal-ruido y las condiciones fisiológicas lo más estable posible. El tiempo total de registro para cada neurona individual estaba entre 1 y 3 h.

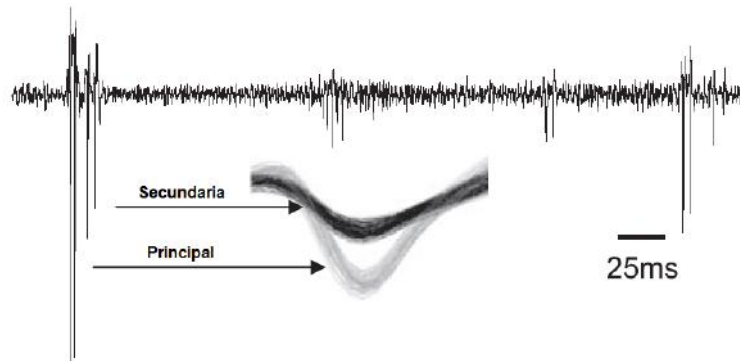


Figura 3.3. Discriminación de dos neuronas registradas con el mismo electrodo. El registro muestra la presencia de al menos tres neuronas. Se muestran las formas de onda representativas de la neurona con mayor amplitud de espiga (líneas grises) y de la neurona con amplitud de espiga intermedia (líneas negras). La neurona con menor amplitud no fue discriminada debido a que no cumplía nuestro criterio mínimo en términos de relación señal-ruido.

3.2.4. Estimulación táctil

Una vez que una neurona era aislada y clasificada como localizada en el VPM, en la región de la extremidad anterior del VPL o en la región de la extremidad posterior del VPL, se aplicaban los protocolos de estimulación táctil. Para ello, en primer lugar se localizó el campo receptor principal de la neurona, definido como la vibrisa o área cutánea que produce la respuesta con mayor magnitud (número de espigas por estímulo) y menor latencia (Aguilar & Castro-Alamancos, 2005). En el campo receptor principal de todas las células ($n = 41$), se aplicó un protocolo de estimulación ON-OFF, que consistía en una serie de 100 pulsos cuadrados a frecuencia de 0.5 Hz y 500 ms de duración. Las vibrisas se estimularon en el sentido preferido a lo largo del eje dorso-ventral (Lee *et al.*, 1994; Friedberg *et al.*, 1999). El sentido dorso-ventral preferido se determinó manualmente antes del protocolo de estimulación.

En un subgrupo de células ($n = 32$), se aplicó además un protocolo de estimulación con estímulos impulsivos, que consistía en una serie de 100 pulsos cuadrados a frecuencia de 0.5 Hz y 1 ms de duración, también en el campo receptor principal. Así, los estímulos impulsivos se aplicaron en la

misma vibrisa o en la misma región cutánea usada para los estímulos ON-OFF en cada célula. Nótese que los estímulos ON-OFF y los estímulos impulsivos representan dos extremos del mismo patrón de estimulación: serie de pulsos cuadrados de larga (500 ms) o corta (1 ms) duración, respectivamente. En otras palabras, un estímulo impulsivo es un estímulo ON-OFF muy corto.

En un subgrupo de células ($n = 12$), también se aplicó el protocolo de estimulación ON-OFF en un campo receptor secundario excitador (una vibrisa adyacente o un dígito adyacente).

Todos los estímulos fueron generados usando un estimulador eléctrico Master8 (A.M.P.I., Jerusalén, Israel) con un aislador de estímulos ISO-Flex (A.M.P.I.). Los pulsos eléctricos se transmitían a un sensor piezoeléctrico unido a una barra rígida de tungsteno (0.5 mm de diámetro, 2.5 cm de longitud, con el extremo de 5 mm de longitud curvado 90°). El sensor piezoeléctrico transforma pulsos eléctricos en movimientos mecánicos, cuyo rango depende del voltaje. Se usó un voltaje de 90 V, el cual imponía un movimiento vertical final de 0.5 mm de la barra de tungsteno. La barra de tungsteno se situó manualmente, bajo control microscópico (Leica M300; Leica Microsystems), a unos pocos milímetros de la vibrisa o de la región cutánea seleccionada previamente, pero nunca tocándola. La frecuencia de 0.5 Hz fue elegida para evitar adaptación, ya que incluso en condiciones de anestesia profunda, las neuronas tálamo-corticales pueden responder consistentemente a estímulos somatosensoriales aplicados a frecuencias de 1 Hz (Castro-Alamancos, 2002; Aguilar & Castro-Alamancos, 2005). La salida del estimulador Master8 se envió a la tarjeta CED Power 1401 y se registró en Spike2 junto con las señales, lo que nos permitió usarlo como referencia en los posteriores análisis de las respuestas neuronales.

3.2.5. Análisis de datos

En este estudio se tomó como estímulo ON el inicio del pulso cuadrado de 500 ms y como estímulo OFF el final del mismo.

3.2.5.1. Análisis fisiológico

3.2.5.1.1. Discriminación de neuronas individuales desde los registros electrofisiológicos

Tras los experimentos, el análisis de los datos comenzó con la discriminación de las neuronas individuales dentro de los registros electrofisiológicos. Para ello, primero se filtraron digitalmente las señales con un filtro pasa-banda en el rango de 300 a 3000 Hz (Figura 3.3). De este modo, se eliminaban los componentes de frecuencia lenta dentro de las señales, como el potencial de campo local, y se seleccionaban únicamente los componentes de frecuencia rápida, entre los cuales estaban las espigas cuya frecuencia estaba alrededor de los 1000 Hz (Figura 3.4).

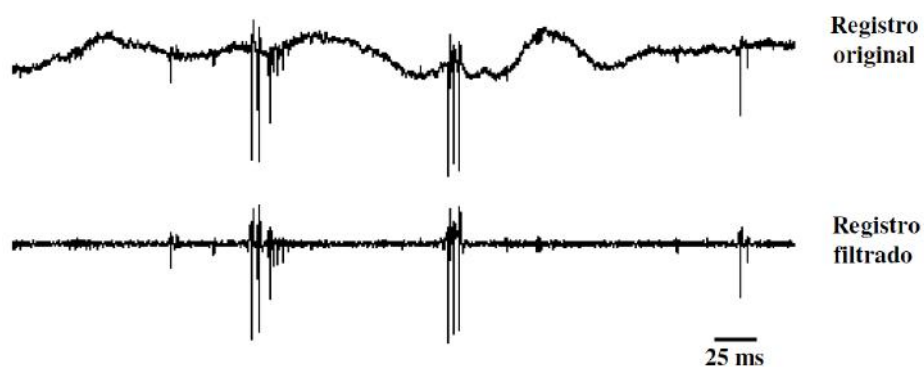


Figura 3.4. Filtrado de los registros. Arriba se muestra un registro original. Abajo se muestra ese registro filtrado con un filtro pasa-banda entre 300-3000 Hz, que elimina el potencial de campo local (componentes lentos del registro) y mantiene las espigas (componentes rápidos).

A partir de los registros filtrados, se emplearon conjuntamente dos métodos para la discriminación y separación de neuronas individuales:

1. *Umbral de voltaje*: este método nos permitía separar las neuronas cuyas espigas tenían una amplitud que superaba el valor impuesto al umbral y era muy efectivo cuando una neurona tenía espigas con amplitud claramente diferenciada del resto de neuronas del registro (Figura 3.5).

2. "*Spike sorting*": es un método de clasificación semiautomática de las espigas de un registro y está disponible en el software Spike2 (v5.03; Cambridge Electronic Design). Este método clasifica cada espiga en base a unos parámetros de las propiedades de las espigas (forma, amplitud, duración, frecuencia de aparición en el registro,...) especificados por el usuario (Figura 3.5).

Sin embargo, estos métodos no siempre conducían a una correcta separación de las neuronas del registro, por lo que, además de emplear estos métodos, se realizó un meticuloso análisis manual en el cual se revisaron cada una de las espigas de los registros, con el fin de ser consistentes en la discriminación y separación neuronal. El número total de neuronas discriminadas de los registros obtenidos de los 13 animales fue 41.

3.2.5.1.2. Construcción de histogramas de tiempo peri-estímulo

Una vez separadas las espigas correspondientes a una misma neurona durante los registros, se construían los histogramas de tiempo peri-estímulos (PSTH).

Los PSTHs representan la distribución temporal de las espigas alrededor del estímulo y se realizaron con una resolución temporal (bin) de 1 ms. Así, cada bin del histograma representaba el número total de espigas que a través de las 100 repeticiones (pruebas) del estímulo aparecían en esa ventana temporal como respuesta al estímulo. Para cada neurona, se construyeron tres PSTHs que correspondían a los tres tipos de estímulos (estímulos ON, estímulos OFF y estímulos impulsivos).

3.2.5.1.3. Medidas analizadas

El análisis de datos se basó en dos medidas principales extraídas de los PSTH de las respuestas de neuronas individuales: la magnitud de la respuesta, calculada como el promedio de espigas por estímulo, y la latencia de la respuesta, calculada como el intervalo temporal entre el inicio del estímulo y el inicio de la respuesta. La latencia de la respuesta OFF se calculó con respecto

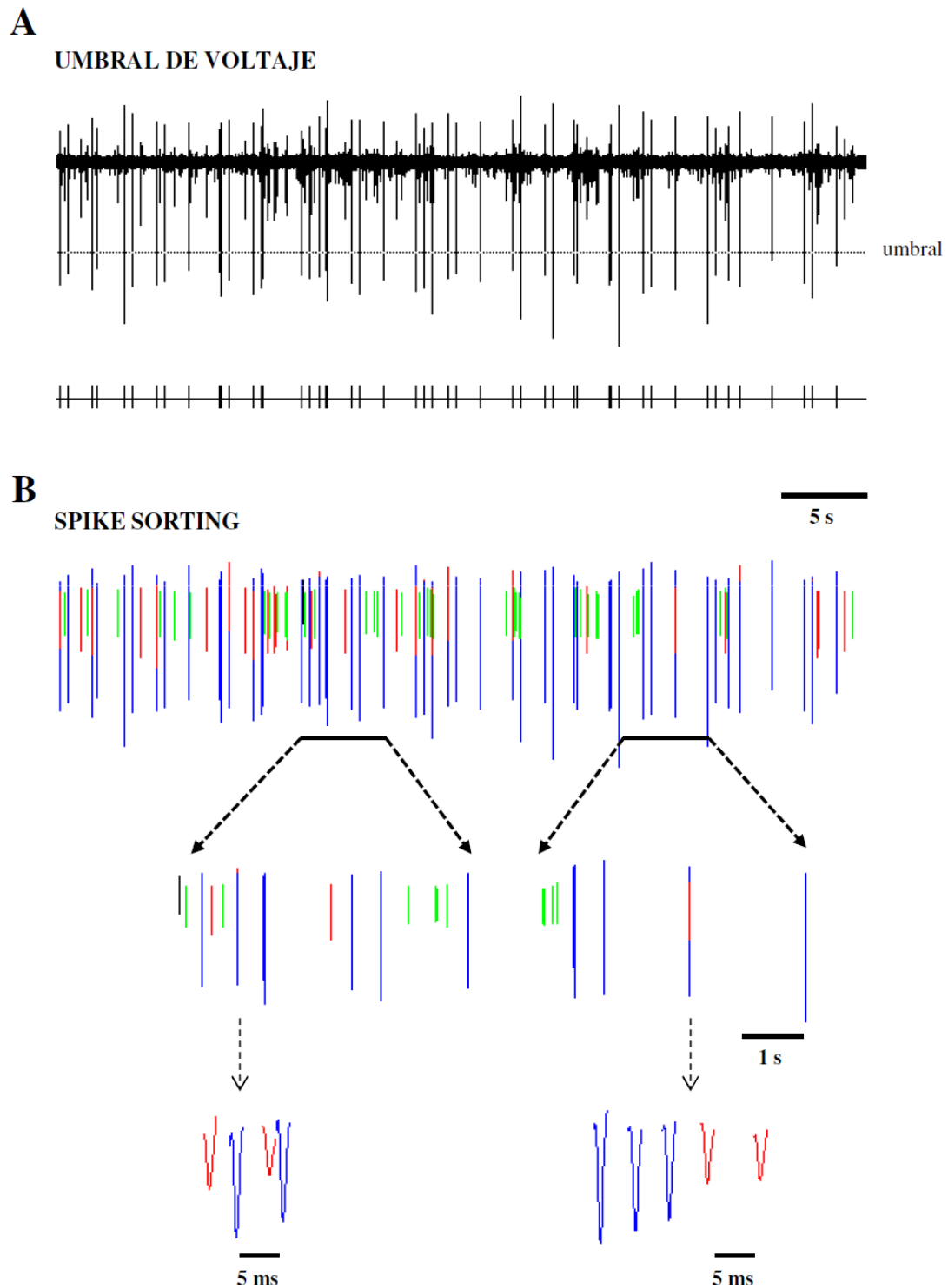


Figura 3.5. Métodos de discriminación neuronal. (A) Método de umbral de voltaje, todas las espigas que superan el umbral fijado son separadas del resto de espigas del registro. (B) "Spike sorting" separa las espigas dentro del registro según unos parámetros especificados. Las espigas de una misma neurona aparecen en el mismo color. En el registro, aparece en azul la neurona principal y en rojo la neurona secundaria. Una tercera neurona (verde) es distinguible en el registro, pero no se incluyó en los análisis debido a que no respondía a los estímulos.

al estímulo OFF. Además de estas medidas, se introdujo el índice de sintonía ON-OFF, índice adimensional que nos permitió determinar si una neurona presentaba mayor respuesta al estímulo ON que al estímulo OFF y se definió como: $MR_{ON} / (MR_{ON} + MR_{OFF})$, donde MR_{ON} indica la magnitud de la respuesta al estímulo ON, y MR_{OFF} indica la magnitud de la respuesta al estímulo OFF, ambos expresados en espigas por estímulo. Finalmente, se estimó la tasa de disparo espontáneo de cada neurona como el promedio de espigas por unidad de tiempo. Esto se realizó en una ventana de 200 ms antes de cada tipo de estímulo (estímulo ON, estímulo OFF y estímulo impulsivo) para comparar el estado neurofisiológico de las neuronas y confirmar la estabilidad de los registros a lo largo de los protocolos de estimulación.

3.2.5.1.4. Análisis estadístico

3.2.5.1.4.1. Respuestas ON y respuestas OFF en el complejo ventrobasal

Para comparar las respuestas a estímulos ON y estímulos OFF entre neuronas en diferentes representaciones del complejo ventrobasal (VPM, región de la extremidad anterior del VPL o región de la extremidad posterior del VPL) y entre diferentes anestésicos (pentobarbital o uretano), las magnitudes y latencias de las respuestas ON, de las respuestas OFF y la sintonía ON-OFF fueron introducidos separadamente en un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores con medidas independientes. El primer factor era la representación corporal de la neurona, con tres niveles: vibrisas, extremidad anterior y extremidad posterior. El segundo factor era el anestésico, con dos niveles: pentobarbital y uretano.

3.2.5.1.4.2. Comparación entre respuestas ON y respuestas OFF

Las respuestas ON y las respuestas OFF se compararon en cada célula usando un *t*-test pareado. Y se testaron las correlaciones en la magnitud y

latencia entre las respuestas ON y las respuestas OFF usando el coeficiente de correlación de Pearson.

3.2.5.1.4.3. Respuestas ON-OFF y respuesta impulsiva

Se compararon las respuestas a estímulos impulsivos entre neuronas en diferentes representaciones del complejo ventrobasal (VPM, región de la extremidad anterior del VPL o región de la extremidad posterior del VPL) y entre diferentes anestésicos (pentobarbital o uretano) usando el mismo tipo de ANOVA diseñada en el apartado anterior para la comparación de las respuestas ON y las respuestas OFF. Para comparar las respuestas neuronales a los estímulos ON-OFF con las respuestas a estímulos impulsivos se realizaron tres análisis. Primero, se investigó si las magnitudes de las respuestas impulsivas eran diferentes de las magnitudes de las respuestas ON o de la suma de las magnitudes de las respuestas ON y OFF, usando un *t*-test pareado. Segundo, se verificó si las magnitudes y latencias de las respuestas impulsivas correlacionaban con las magnitudes y latencias de las respuestas ON y de las respuestas OFF, usando el coeficiente de correlación de Pearson. Finalmente, se testó si la sintonía ON-OFF podía ser usada para predecir la preferencia de una neurona, en términos de magnitud de respuesta, a los estímulos ON comparada con los estímulos impulsivos. Para ello, se testó si la sintonía ON-OFF correlacionaba con el cociente entre la magnitud de la respuesta a los estímulos impulsivos y la magnitud de la respuesta a los estímulos ON, de nuevo, usando el coeficiente de correlación de Pearson.

3.2.5.1.4.4. Estructura espacial de las respuestas ON-OFF

Para investigar si la estructura espacial de las respuestas OFF es similar a la estructura espacial de las respuestas ON, se testó si tres medidas principales (magnitud de las respuestas ON, magnitud de las respuestas OFF y la sintonía ON-OFF) decrecían cuando se movía el estímulo desde el campo receptor principal de la neurona hasta un campo receptor secundario excitador (vibrisa adyacente o dígito adyacente). Para ello se empleó *t*-test pareado.

Los valores se daban como media \pm desviación estándar. Todas las medidas fueron exportadas a Matlab (versión 6.5; The Mathworks) para el análisis estadístico. Los resultados se consideraron significativos si $p < 0.05$.

3.2.5.2. Análisis de información

El problema básico fue cuantificar cuánta información podía ser extraída sobre la discriminación de la localización y de la dinámica del estímulo a partir de la respuesta a pruebas individuales (100 en total) de neuronas talámicas unitarias, usando tanto la magnitud de la respuesta como los aspectos temporales. Como modelo de discriminación de la localización del estímulo, se consideró el problema de la discriminación entre estímulos en el campo receptor principal y en el campo receptor secundario. Como modelo de discriminación de la dinámica del estímulo, se consideró el problema de discriminación entre los estímulos ON y OFF aplicados en la misma localización. La principal diferencia entre la discriminación entre los estímulos ON y OFF y la discriminación de la localización del estímulo es la siguiente: independientemente de si la diferente dinámica del estímulo ON respecto al estímulo OFF (sentido opuesto de movimiento del estimulado) activa diferentes receptores periféricos, los estímulos ON y OFF permanecían confinados en una única región cutánea (o vibrisa) que somatotópicamente correspondía al mismo agregado talámico (cluster o barriloide); por el contrario, en la discriminación de la localización del estímulo, los estímulos aplicados en diferentes dedos (o vibrisas) somatotópicamente correspondían a diferentes agregados talámicos (o barriloides). Sin embargo, los principios básicos de codificación a estudiar son los mismos para la discriminación de la localización del estímulo y para la discriminación entre los estímulos ON y OFF.

En este estudio el término “información” hace referencia a la fórmula de Shannon para la información mutua entre las respuestas de neuronas individuales y los estímulos. Discriminar dos estímulos es un problema binario, por lo que, la máxima información, es decir, la entropía de los estímulos, es 1 bit. Cuando la respuesta de una neurona permite determinar sin error el estímulo que la origina, entonces, esa respuesta aporta 1 bit de información.

Para corroborar que nuestros principales resultados no eran específicos de la discriminación binaria, en neuronas en las que se estimuló el campo receptor principal y el campo receptor secundario excitador, se realizó también una discriminación entre los cuatro estímulos disponibles (estímulo ON en el principal, estímulo ON en el secundario, estímulo OFF en el principal y estímulo OFF en el secundario). En este caso, la entropía de los estímulos es 2 bits.

3.2.5.2.1. Información extraída de la magnitud de las respuestas

Para extraer la información contenida en el número de espigas de la respuesta, por cada neurona se consideró una ventana temporal de 40 ms de longitud tras el estímulo, se contó el número de espigas que produce la neurona en cada repetición del estímulo (prueba), se estimaron las probabilidades condicionales de las respuestas dados los estímulos, y se calculó directamente la información mutua entre respuestas y estímulos de la siguiente manera:

$$I(r, s) = \sum_s \sum_r P(s) P(r | s) \log_2 \left(\frac{P(r | s)}{P(r)} \right), \quad (1)$$

donde $P(s)$ es la probabilidad de que ocurra el estímulo s , la cual era siempre 0.5 para ambos estímulos debido a que el número de pruebas para cada estímulo era siempre el mismo (100), $P(r | s)$ es la probabilidad condicional de que la respuesta r ocurra dado el estímulo s , y $P(r)$ es la probabilidad de que la respuesta r ocurra dado cualquier estímulo. Debido a que las respuestas de nuestras neuronas casi nunca excedían de 4 espigas por estímulo en cualquier prueba, la sobreestima de la información mutua atribuible a un muestreo finito se minimizó experimentalmente usando 20 veces más pruebas por estímulo (100) que número de respuestas posibles (5).

3.2.5.2.2. Información extraída de la distribución temporal de las respuestas

Para calcular la información considerando la distribución temporal de las respuestas, se dividió la ventana de tiempo post-estimulo en 40 bins de 1 ms y se registró la presencia o ausencia de una espiga en cada bin como 1 o 0. Con 40 bins de 1 ms, una respuesta neuronal a un estímulo puede ser algo como lo siguiente: 000000010001000000000000000000000000000000. Donde la neurona dispara dos espigas, la primera a 8 ms después del estímulo y la segunda a 12 ms. Calcular la información mutua con ese tipo de respuestas es algo problemático, puesto que el número de respuestas posibles es demasiado alto para que la información mutua entre esas respuestas y los estímulos pueda ser estimada con precisión, debido al número finito de pruebas disponibles experimentalmente (en nuestro caso 100), lo cual produce una sobreestima en la medida de la información mutua (Panzeri et al., 2007; Nemenman et al., 2008). Para evitar este problema, se redujo la dimensionalidad de las respuestas usándolas para clasificar los estímulos. Para ello, se usó un método de clasificación basado en un histograma de tiempo peri-estimulo (PSTH) (Foffani & Moxon, 2004), que consiste en crear para cada tipo de estímulo un PSTH de las respuestas neuronales y clasificar la respuesta a cada prueba mediante asignación al estímulo con PSTH más cercano en el sentido de distancia euclidiana. Y se calcula la información mutua, no entre los estímulos y las respuestas, sino entre los estímulos predichos por el método y los estímulos aplicados realmente. La información mutua entre el estímulo predicho σ y el estímulo real s se obtiene de la siguiente manera:

$$I(\sigma, s) = \sum_s \sum_{\sigma} P(s) P(\sigma | s) \log_2 \left(\frac{P(\sigma | s)}{P(\sigma)} \right), \quad (2)$$

donde $P(s)$ es la probabilidad de que ocurra el estímulo s (en nuestro caso, 0.5 para ambos estímulos), $P(\sigma | s)$ es la probabilidad de predecir el estímulo σ

cuando el estímulo aplicado es s , y $P(\sigma)$ es la probabilidad de predecir el estímulo σ independientemente de qué estímulo es aplicado realmente. La manera de estimar las probabilidades condicionales $P(\sigma | s)$ usando el clasificador basado en PSTH puede ser formalizado de la siguiente manera:

$$P(\sigma = i | s = j) = \frac{1}{N} \sum_{t \in j} \left(\min_{s'} [X(s', t)] \equiv i \right)$$

$$X(s', t) = \begin{cases} \sum_b (r_b(t) - \bar{r}_b(s'))^2 & s' \neq j \\ \sum_b \left(r_b(t) - \left(\bar{r}_b(s') - \frac{r_b(t)}{N} \right) \frac{N}{N-1} \right)^2 & s' = j \end{cases} \quad (3)$$

donde N es el número de pruebas por estímulo ($N = 100$), $t \in j$ indica los pruebas correspondientes al estímulo $s = j$, el mínimo se calculó entre todos los tipos de estímulos (en nuestro caso dos), $r_b(t)$ representa la respuesta en el bin b ($b = 1:40$) de la prueba t , y $\bar{r}_b(s')$ es el valor del PSTH correspondiente al estímulo s' en el bin b y se calculó como:

$$\bar{r}_b(s' = k) = \frac{1}{N} \sum_{t \in k} r_b(t), \quad (4)$$

Cuando la respuesta a una prueba $r_b(t)$ correspondiente al estímulo j se comparaba con el PSTH $\bar{r}_b(s')$ correspondiente al mismo estímulo $s' = j$, la respuesta a esa prueba se sustraía del PSTH en el cálculo de la distancia euclidiana $X(s', t)$ para garantizar la completa validez de la clasificación (Foffani & Moxon, 2004). La sobreestima de la información mutua, debido a un muestreo finito, se minimizó experimentalmente usando 50 veces más pruebas por estímulo que número posible de estímulos diferentes (dos). La información mutua $I(\sigma, s)$ entre los estímulos predichos y los estímulos reales representa un límite inferior de la información mutua entre las respuestas neuronales

divididas en bins y los estímulos (Kjaer et al., 1994; Rolls et al., 1997; Furukawa and Middlebrooks, 2002; Schneidman et al., 2003).

3.2.5.2.3. Información extraída de la magnitud de las respuestas, información extraída de la distribución temporal de las respuestas e información temporal

El concepto de distribución temporal de las respuestas implícitamente considera cuántas espigas ocurrieron y cuándo ocurrieron. Este concepto no está relacionado con el método particular que se ha usado para estimar la información de la distribución temporal (método de clasificación basado en PSTHs), sino que es intrínseco en la manera en que las respuestas son consideradas para construir los símbolos del código, es decir, división de la ventana de respuesta en bins. Esto es consistente con estudios previos en los que aplicaron medidas de información al sistema somatosensorial de la rata (Panzeri et al., 2001; Petersen et al., 2001; Foffani et al., 2004; Arabzadeh et al., 2006; Montemurro et al., 2007; Foffani et al., 2008).

En el presente trabajo, se ha considerado explícitamente que la información extraída desde la distribución temporal de las respuestas incluye tanto información de la magnitud de respuesta (cuántas espigas ocurrieron) como información temporal (cuándo ocurrieron). En general, la información temporal y la información extraída de la magnitud de la respuesta no son independientes. Definiendo ΔI como la sinergia/redundancia entre la información temporal $I_{temporal}$ y la información de la magnitud de respuesta I_{MR} , podemos escribir la siguiente relación intuitiva (Nelken et al., 2005): $I_{distribución-temporal} = I_{MR} + I_{temporal} + \Delta I$. El término de sinergia/redundancia ΔI es cero no solo cuando la información de la magnitud de respuesta y la información temporal son independientes, sino también cuando la información contenida en la magnitud de respuesta es cero. En esos casos toda la información es información temporal.

Para testar si la información temporal sola era mayor que la información extraída de la magnitud de respuesta, se realizaron dos análisis:

(1) El primer análisis consistió en considerar solo la primera espiga de la respuesta en cada prueba y solo pruebas en las que había respuesta, es decir, pruebas con espigas (Nelken et al., 2005). En esta condición, la información extraída de la magnitud de respuesta era idénticamente nula, por lo que, toda la información estimada con el método de clasificación basado en PSTH, considerando la distribución temporal, era información temporal.

(2) El segundo análisis consistió en seleccionar neuronas que presentasen similares magnitudes de respuesta a los estímulos. En esas neuronas, la información extraída de la magnitud de respuesta debería ser próxima a cero, por lo que, la diferencia entre la información obtenida considerando la distribución temporal y la información obtenida considerando la magnitud de respuesta, representará un límite inferior próximo de la información temporal, es decir, casi toda la información obtenida considerando la distribución temporal será información temporal.

3.2.5.2.4. Simulaciones con latencias y jitters

Para investigar más profundamente los elementos básicos del código temporal, se realizaron una serie de experimentos computacionales. Usando los datos fisiológicos como punto de partida, las simulaciones permitieron explorar un rango de parámetros de respuesta mayor que los disponibles en la variabilidad fisiológica. Se modularon tres parámetros principales de las respuestas a los estímulos ON y OFF: (1) la diferencia de latencia entre estímulos, (2) el jitter total de las respuestas, y (3) la diferencia de jitter entre los estímulos. Definiendo "jitter" como la variabilidad temporal de las respuestas de una neurona ante un mismo estímulo. Estos tres parámetros representan las propiedades fundamentales de las respuestas simuladas y la información obtenida con esas simulaciones permitirá llevar los resultados a un nivel más general.

Para modular la diferencia de latencia, por cada neurona primero se alinearon las respuestas a los dos estímulos, de forma que la diferencia de latencia fuese 0 ms. A continuación, se movieron las respuestas de uno de los

estímulos con respecto a las otras, para imponer una determinada diferencia de latencia. Esta operación se repitió incrementando la diferencia de latencia (en pasos de 0.2 ms). Para cada diferencia de latencia, se calculó la información que podía extraerse de la distribución temporal de las respuestas a cerca de la discriminación entre los dos estímulos.

Para modular el jitter total, definido como la desviación estándar de la latencia de la primera espiga promediada entre los dos estímulos (ON y OFF), se añadió ruido gaussiano a la latencia de la primera espiga de cada prueba, resultando en un incremento del jitter total de las respuestas neuronales. Esta operación se repitió con incrementos de la varianza del ruido gaussiano (en pasos de 1 ms), resultando en un incremento del jitter total. Para cada valor del jitter, se calculó la información que podía extraerse de la distribución temporal de las respuestas a cerca de la discriminación entre los dos estímulos. Nótese, que añadir jitter a las respuestas neuronales es formalmente equivalente a añadir jitter a la referencia temporal de las respuestas (es decir, los estímulos), lo cual puede ser interpretado en términos de imprecisión de un decodificador. Así, los resultados también proporcionarán los requerimientos básicos para que un decodificador sea capaz de extraer la información temporal de las respuestas neuronales.

Para modular la diferencia de jitter, se añadió ruido gaussiano a la latencia de la primera espiga de cada prueba del estímulo con menor jitter hasta alcanzar una diferencia de jitter de aproximadamente cero. Entonces se incrementó la varianza del ruido gaussiano (en pasos de 5 ms), resultando en un incremento de la diferencia de jitter entre los estímulos. Para cada diferencia de jitter, se calculó la información que podía extraerse de la distribución temporal de las respuestas a cerca de la discriminación entre los dos estímulos.

Las simulaciones descritas anteriormente se combinaron también para investigar la contribución conjunta de diferencias de latencia, jitter total y diferencias de jitter a la información temporal.

Los valores serán dados como media \pm desviación estándar. Las comparaciones estadísticas son realizadas con t test pareado o ANOVA de

medidas repetidas. Los resultados son considerados significativos para $p < 0.05$. Todos los análisis fueron realizados en Matlab (versión 7.1, The Mathworks).

3.3. ESTUDIO FISIOLÓGICO EN CORTEZA SOMATOSENSORIAL

3.3.1. Procedimiento quirúrgico

Los animales fueron anestesiados con uretano (1.0-1.5 g/Kg) aplicado intraperitonealmente. Durante el experimento, el nivel de anestesia de los animales se comprobó pinchando la cola, de forma que, si aparecía reflejo se suministraba uretano adicional ($< 20\%$ de la dosis inicial). Una vez que la anestesia hizo efecto, los animales se colocaron en el aparato estereotáxico (SR-6R; Narishige Scientific Instruments, Tokyo, Japón). Se aplicó lidocaína 2% sobre la superficie corporal en contacto con el mismo y sobre las zonas de incisión. Se realizó una gran craneotomía en el hemisferio izquierdo sobre las regiones de la corteza somatosensorial primaria que somatotópicamente correspondían a las extremidades (Antero-Posterior = 2:-4 y Medio-Lateral = 1:5, Atlas de Paxinos & Watson, 1986). Durante la craneotomía se tuvo especial cuidado de mantener la dura intacta, de forma que no hubiese regiones corticales con dura y otras sin dura, ya que en ese caso, la tinción de la corteza no sería uniforme, puesto que en las zonas sin dura el VSD penetraría en mayor proporción y, por tanto, la intensidad de las señales VSD recibidas no sería uniforme, sino que sería mayor en las zonas sin dura. La dura se mantuvo debido a que disminuía los artefactos en la imagen producidos por movimiento de la corteza como consecuencia, por ejemplo, del latido del corazón o de la respiración del animal. Para garantizar que toda la región cortical visualizada estuviese en el mismo plano focal (1) se abrió la cisterna magna y así se consiguió reducir la curvatura de la corteza debido a presión intracraneal y (2) el aparato estereotáxico se inclinó aproximadamente 10° . Durante todo el experimento la temperatura de los animales se mantuvo constante a 36°C , mediante una manta térmica controlada automáticamente.

3.3.2. Aplicación del VSD

Para teñir la corteza y así poder visualizar después la activación cortical, se usó el VSD RH1691 (Shoham et al., 1999; Derdikman et al., 2003). El VSD se disolvió a una concentración de 2 mg/ml en solución buffer que contenía (en mM) lo siguiente: 126 NaCl, 3.53 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 26 NaHCO₃, 1 MgSO₄·7H₂O, 10 dextrosa, 1000 CaCl₂. La solución de VSD resultante se aplicó sobre la corteza expuesta y se le permitió difundir a través de la duramadre durante 2 h. Se puso una barrera de agar alrededor de la craneotomía con el fin de evitar que el VSD se perdiera fuera de la corteza. Tras las 2 h de difusión del VSD, se realizó un lavado de la corteza con solución buffer durante 20 - 25 minutos para eliminar el VSD sobrante. Posteriormente, la corteza se cubrió con agar 1 % disuelto en solución buffer y se colocó encima una pequeña porción de un portaobjeto con el objetivo de estabilizar la corteza (Berger et al., 2007).

3.3.3. Técnica de imagen VSD (Voltage-Sensitive Dye)

La señal VSD es proporcional a los cambios de potencial de membrana y a la región de la membrana de los elementos neuronales teñidos bajo cada pixel medido (Grinvald & Hildesheim, 2004; Cohen et al., 1974). *In vivo*, esta señal representa principalmente la actividad de las capas supragranulares 2/3 (Petersen et al., 2003a; Lippert et al., 2007; Chemla & Chavane, 2010) y más específicamente, la actividad dendrítica de las células piramidales ya que éstas proporcionan la mayor contribución al área de membrana visualizado (Shoham et al., 1999; Grinvald & Hildesheim, 2004; Petersen et al., 2003a). Sin embargo, el VSD no es sensible a espigas, puesto que éstas suponen un pequeñísimo porcentaje del cambio total de potencial de membrana medido (Petersen et al., 2003a; Berger et al., 2007). Más bien, las señales VSD son similares (proporcionales) al potencial de campo local registrado eletrofisiológicamente (Shoham et al., 1999; Grinvald & Hildesheim, 2004; Devonshire et al., 2010; Lippert et al., 2007; Berger et al., 2007; Contreras & Llinás, 2001). Ambos representan actividad poblacional, y ambos métodos pueden medir con buena resolución temporal (imagen VSD alcanza una resolución de 0.1 ms). Sin

embargo, la técnica de imagen VSD permite también registrar simultáneamente una amplia región cortical con gran resolución espacial ($> 50 \mu\text{m}$) (Grinvald & Hildesheim, 2004). Esto sería equivalente a situar 10000 electrodos en un área de 5 mm x 5 mm.

3.3.4. Registro de las respuestas VSD

Se aplicó la técnica de imagen VSD para estudiar las dinámicas de activación en las capas supragranulares de la corteza somatosensorial de la rata por estimulación de las extremidades. Para registrar las señales VSD, se usó luz procedente de una lámpara halógena de 150 W controlada automáticamente por un shutter electromagnético (MHAB-150W, MORITEX). La luz fue filtrada pasa-banda a 632 nm (filtro de excitación FF01-632/22-25) y reflejada hacia la corteza por un espejo dicróico (FF650-Di01, reflexión: 500-640 nm, transmisión: 660-825 nm) para excitar el VSD. La luz emitida por el VSD desde la corteza, después de ser transmitida sin cambios a través del espejo dicróico, fue filtrada pasa-alto a 665 nm (filtro de emisión RG-665) y finalmente registrada usando el sistema MICAM ULTIMA-L (BrainVision Inc.). La razón por la que se emplea esta configuración estándar para el registro de señales VSD es que el filtro de excitación, espejo dicróico y filtro de emisión están diseñados para separar y optimizar la fluorescencia de excitación (menor longitud de onda) y la fluorescencia de emisión (mayor longitud de onda) del VSD RH1691, maximizando de ese modo la relación señal-ruido en el registro de la señal VSD. Un diagrama representativo del diseño experimental empleado se muestra en la figura 3.6.

La cámara capturaba imágenes con 100 x 100 pixels. El tamaño de la región cortical visualizada era 5 mm x 5 mm, así cada pixel cubría un área de $50 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$ (resolución espacial). Los registros se realizaron por eventos, es decir, no se registró de forma continua sino que únicamente se registraba cuando se aplicaba un estímulo. Cada registro tenía una duración de 500 ms, 250 ms previos al estímulo, para capturar la actividad espontánea y 250 ms posteriores al estímulo, para capturar la respuesta al mismo. En ese registro de

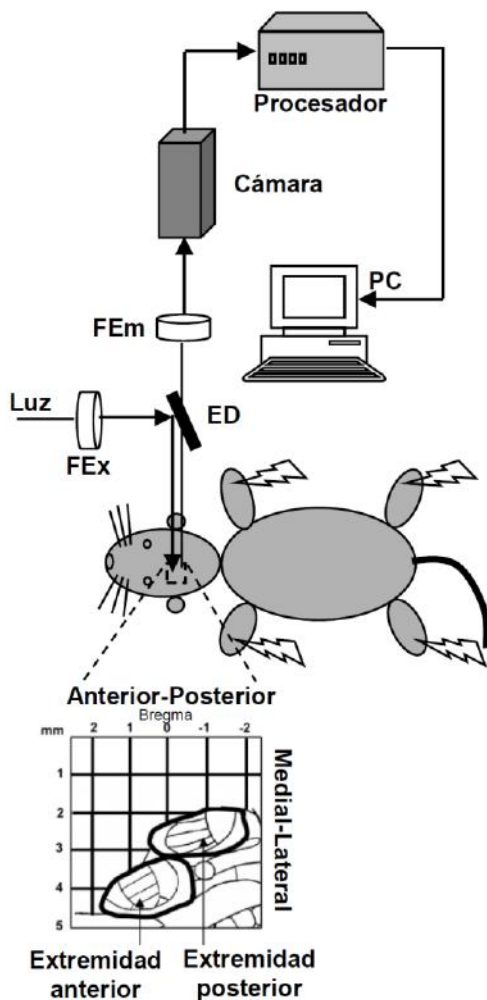


Figura 3.6. Diseño experimental. Se registraron las señales VSD desde la corteza somatosensorial de un hemisferio de la ratona en respuesta a estimulación eléctrica de las extremidades. Para registrar las señales VSD, la luz se filtraba pasa-banda a 632 nm mediante un filtro de excitación (FEx) y se reflejaba hacia la corteza con un espejo dichroico (ED, 650 nm). La fluorescencia emitida por el VSD se transmitía sin cambios a través del ED y se filtraba pasa-alta con un filtro de emisión (FEm) y finalmente se registraba usando el sistema MICAM ULTIMA-L (Brain Vision Inc.), el cual estaba compuesto por una cámara de alta velocidad y su correspondiente procesador. La región cortical de 5 x 5 mm registrada está representada en la parte inferior de la figura. Las líneas negras delimitan las regiones que representan a las extremidades anterior y posterior en el mapa somatotópico de la corteza somatosensorial primaria de la ratona.

500 ms se tomaba una imagen cada 0.5 ms (resolución temporal), así, cada registro estaba compuesto por 1000 imágenes. La señal VSD disminuía a lo largo de cada registro ("bleaching"), para minimizar este fenómeno, después de cada registro con estímulo, se realizaba un registro de la misma duración pero en el cual no se aplicaba estímulo (frecuencia de registro final, 0.1 Hz; frecuencia de estimulación, 0.05 Hz). Este registro se substruía, imagen a imagen, del registro con estímulo (Berger et al., 2007). A dicho registro con estímulo menos el registro sin estímulo es lo que en esta sección denominamos prueba.

3.3.5. Estimulación eléctrica

Los estímulos eléctricos eran generados como pulsos cuadrados usando un estimulador digital (DS8000) con un aislador de estímulo ISO-Flex (A.M.P.I.). Los pulsos eléctricos se aplicaron con agujas localizadas subcutáneamente a ambos lados de la muñeca de las extremidades anteriores y posteriores. El protocolo de estimulación consistió en una secuencia de 30 pulsos cuadrados de 2 ms de duración y frecuencia de 0.05 Hz. Se usó esta baja frecuencia de estimulación con el objetivo de minimizar los efectos de la fototoxicidad (Derdikman et al., 2003; Grinvald and Hildesheim, 2004). Se aplicó este protocolo de estimulación separadamente en las cuatro extremidades, primero empleando estímulos de baja intensidad (0.6 mA) y después estímulos de alta intensidad (6 mA). Se pretendía que los estímulos de baja intensidad activasen solo una fracción de las fibras disponibles, principalmente fibras de bajo umbral que corren a través de la vía lemniscal, desde las columnas dorsales hacia el tronco del encéfalo (Woolf and Wall, 1982; Lilja et al., 2006; Yague et al., 2011). Mientras que con los estímulos de alta intensidad se pretendía activar el máximo número de fibras, incluyendo las fibras primarias de alto umbral que hacen sinapsis en la raíz dorsal de la médula espinal, activando sucesivamente el tracto espinotalámico (Woolf and Wall, 1982; Lilja et al., 2006; Yague et al., 2011).

En este estudio se usaron un total de 11 ratas: 9 de las 11 con estimulación contralateral a baja intensidad, 9 de las 11 con estimulación contralateral a alta intensidad y 6 de las 11 con estimulación ipsilateral.

3.3.6. Análisis de datos

Para mejorar la relación señal-ruido, se realizó el promedio de las 30 pruebas y sobre dicho promedio se aplicó un filtro temporal (filtro pasa bajo de 200 Hz) y un filtro espacial (filtro pasa bajo gaussiano: número de filas = 3, número de columnas = 3, sigma = 1). El análisis de datos se realizó sobre ese promedio resultante, considerando una ventana temporal de 50 ms antes del estímulo (ventana pre-estímulo) y una ventana temporal de 100 ms después del estímulo (ventana post-estímulo) con una resolución temporal de 0.5 ms.

Para definir la región cortical activada en cada instante temporal, se consideró el siguiente criterio: el valor de la señal en cada pixel debía ser (1) mayor que la media más cinco veces la desviación estándar de la señal en la ventana pre-estímulo y (2) al menos la mitad de la menor de los valores máximo de la señal producida por los diferentes estímulos (en diferentes extremidades y con diferentes intensidades) en cualquier pixel dentro de la ventana post-estímulo. Los pixels que no verificaban las condiciones anteriores se consideraron no activados (valor = 0). Las condiciones por las cuales un pixel se consideró activado puede ser expresado de la siguiente manera:

$$S^*(i, j, t) = \begin{cases} S(i, j, t) & \text{si } S(i, j, t) > \bar{S}_{Pre}(i, j) + 5 * \sigma_{Pre}(i, j) \text{ y} \\ & S(i, j, t) \geq 0.5 * \min[\{\max(S_{E1}(i, j, t)) \max(S_{E2}(i, j, t)) \dots\}] \\ 0 & \text{en caso contrario} \end{cases} \quad (5)$$

$$\bar{S}_{Pre}(i, j) = \frac{\sum_{t'} S_{Pre}(i, j, t')}{n_{Pre}} \quad \sigma_{Pre}(i, j) = \left[\frac{\sum_{t'} (S_{Pre}(i, j, t') - \bar{S}_{Pre}(i, j))^2}{n_{Pre} - 1} \right]^{1/2}$$

donde $S(i, j, t)$ es el valor inicial de la señal en el pixel (i, j) con $i, j = 1, 2, \dots, 100$ en el instante t en la ventana post-estímulo, y $S^*(i, j, t)$ es el valor de la señal asignado al pixel (i, j) en el instante t en la ventana post-estímulo; $S_{Pre}(i, j, t')$ es el valor de la señal en el pixel (i, j) en el instante t' en la ventana pre-estímulo; $\bar{S}_{Pre}(i, j)$ es el valor medio de la señal en el pixel (i, j) en la ventana pre-estímulo; $\sigma_{Pre}(i, j)$ es la desviación estándar de la señal en el pixel (i, j) en la ventana pre-estímulo; n_{Pre} es el número de puntos temporales en la ventana pre-estímulo (100) y $\{\max(S_{E1}(i, j, t)) \max(S_{E2}(i, j, t)) \dots\}$ son los valores máximos de la señal en cualquier pixel y en cualquier instante en la ventana post-estímulo para los diferentes tipos de estímulos.

Primero, se realizó un análisis de las amplitudes y latencias de las respuestas VSD, lo cual permitió comparar estos resultados VSD con los datos electrofisiológicos clásicos. Posteriormente, haciendo uso de la resolución espaciotemporal proporcionada por la técnica de imagen VSD, se definieron varias medidas que permitieron cuantificar las dinámicas espaciotemporales de la activación cortical producida por los estímulos. Las imágenes se exportaron a Matlab (versión 7.1; The Mathworks) para el análisis de los datos.

3.3.6.1. Amplitud y latencia de las respuestas somatosensoriales corticales

Para estudiar las respuestas VSD en las capas corticales supragranulares, se definió la latencia inicial de la respuesta, L , como el primer instante temporal después del estímulo en el cual había al menos un pixel activado (región activada mayor que cero) (Ec. 6). Entre esos pixels activados inicialmente, la amplitud de la respuesta, Amp , se definió como el valor máximo de la señal dentro de la ventana post-estímulo (Ec. 7), y el instante temporal en el cual la señal alcanzaba este valor máximo se definió como latencia pico, L_p (Ec. 8).

$$L = t_0 \text{ tal que } S^*(i, j, t < t_0) = 0 \quad \forall (i, j) \text{ y } \exists (i, j) \text{ tal que } S^*(i, j, t_0) \neq 0 \quad (6)$$

$$Amp = \max (S^*(i, j, t)) \text{ con } (i, j) \text{ tal que } S^*(i, j, L) \neq 0 \quad (7)$$

$$L_p = t_p \text{ tal que } S^*(i, j, t_p) = Amp \quad (8)$$

3.3.6.2. Extensión de las respuestas somatosensoriales corticales

Para cuantificar la extensión cortical de la activación producida por estímulos somatosensoriales, se calculó el área de la región activada. En cada instante de la ventana post-estímulo, el área $A(t)$ se determinó como el número de pixels activados multiplicado por la dimensión del pixel ($DimPixel = 0.0025 \text{ mm}^2$) (Ec. 9). Para estudiar la velocidad a la cual la activación se expande a través de la corteza, o velocidad de activación $V(t)$, se calculó la derivada del

área con respecto al tiempo en la ventana post-estímulo (Ec. 10). Esta velocidad de activación se midió como mm²/ms.

$$A(t) = DimPixel \cdot \sum_{i,j} (p_A(i, j, t) > 0) \quad \text{donde} \quad p_A(i, j, t) = \begin{cases} 1 & \text{si } S^*(i, j, t) \neq 0 \\ 0 & \text{en caso contrario} \end{cases} \quad (9)$$

$$V(t) = \frac{A(t) - A(t-r)}{r} \quad (10)$$

donde r es la resolución temporal (0.5 ms).

Debido a la gran extensión cortical que puede responder a un estímulo somatosensorial, es probable que un estímulo aplicado en una extremidad produzca respuesta en la región cortical correspondiente a la otra extremidad (Moxon et al., 2008). Para investigar el posible solapamiento entre las regiones corticales activadas por estimulación de las extremidades anterior y posterior, se determinó el máximo solapamiento cortical, Ω , el cual se calculó como el número de pixels que se activaron por estímulos tanto en la extremidad anterior como en la extremidad posterior – multiplicado por la dimensión del pixel – en el instante temporal en el cual el área activada era máxima (Ec. 11).

$$\Omega = DimPixel \cdot \sum_{i,j} (p_{\Omega}(i, j) > 0) \quad (11)$$

$$\text{donde } p_{\Omega}(i, j) = \begin{cases} 1 & \text{si } S^*_{FP}(i, j, t_{FP}) \neq 0 \text{ y } S^*_{HP}(i, j, t_{HP}) \neq 0 \\ 0 & \text{en caso contrario} \end{cases}$$

con t_{FP} tal que $A_{FP}(t_{FP}) = \max(A_{FP}(t))$ y t_{HP} tal que $A_{HP}(t_{HP}) = \max(A_{HP}(t))$

donde $S^*_{FP}(i, j, t_{FP})$ y $S^*_{HP}(i, j, t_{HP})$ son los valores asignados a la señal en el pixel (i, j) cuando estimulamos la extremidad anterior o la posterior, respectivamente.

Además se calcularon la amplitud y latencia de las respuestas en la región cortical correspondiente a la extremidad no estimulada, es decir, en la corteza de la extremidad posterior cuando se estimuló la extremidad anterior y en la corteza de la extremidad anterior cuando se estimuló la extremidad

posterior (el equivalente VSD de las respuestas no homólogas descritas en Moxon et al., 2008). La amplitud y latencia de las respuestas se calcularon en el mismo punto en el que se calculó la amplitud cuando se estimuló la extremidad óptima. También se calculó la velocidad lineal de activación desde la corteza correspondiente a la extremidad anterior a la corteza correspondiente a la extremidad posterior y la velocidad lineal de activación desde la corteza de la extremidad posterior a la corteza de la extremidad anterior. Estas velocidades se calcularon como la diferencia de latencia entre la respuesta en la corteza de la extremidad anterior y la respuesta en la corteza de la extremidad posterior dividida por la distancia entre esas regiones corticales.

3.3.6.3. Direccionalidad de las respuestas somatosensoriales corticales

Para investigar la posible direccionalidad en la dinámica de activación cortical, primero se construyeron mapas de contorno de la evolución temporal de la región activada. Los contornos se representaron cada 1 ms desde el instante correspondiente a la activación inicial hasta el instante el cual el área activada alcanzaba el máximo valor. Cada contorno incluía todos los pixels que, en el correspondiente instante temporal, presentaban una intensidad superior al umbral fijado (50 % de la máxima intensidad entre todos los pixels en la ventana post-estímulo).

Para estudiar cuantitativamente la direccionalidad, se analizó la evolución espaciotemporal del centro de la región activada (centro de activación global) desde el instante correspondiente a la activación inicial hasta que el área activada alcanzaba el máximo valor. Por cada instante temporal, las coordenadas I y J del centro de activación global se calcularon con la misma fórmula empleada para el cálculo de un centro de masas:

$$I(t) = \frac{\sum_i j \cdot \sum_j S(i, j, t)}{\sum_i \sum_j S(i, j, t)} \quad J(t) = \frac{\sum_j i \cdot \sum_i S(i, j, t)}{\sum_i \sum_j S(i, j, t)} \quad i, j = 1, 2, \dots, 100 \quad (12)$$

Para estudiar la no uniformidad de la dirección de propagación de la activación, se extendió el cálculo del centro de activación global al cálculo del centro de activación en cada uno de los cuatro cuadrantes de un sistema de coordenadas en el cual el origen era el centro de activación global en cada instante temporal. Para cada instante t , el cálculo de las coordenadas \bar{i} y \bar{j} del centro de activación en cada cuadrante se realizó de acuerdo con las siguientes expresiones:

$$\bar{i}(t) = \frac{\sum_{i=rangoI} j \cdot \sum_{j=rangoJ} S^*(i, j, t)}{\sum_{i=rangoI} \sum_{j=rangoJ} S^*(i, j, t)} \quad \bar{j}(t) = \frac{\sum_{j=rangoJ} i \cdot \sum_{i=rangoI} S^*(i, j, t)}{\sum_{i=rangoI} \sum_{j=rangoJ} S^*(i, j, t)} \quad (13)$$

$$rangoI = \begin{cases} i \geq I(t) & \text{en cuadrantes 1 y 4} \\ i < I(t) & \text{en cuadrantes 2 y 3} \end{cases}$$

$$rangoJ = \begin{cases} j \geq J(t) & \text{en cuadrantes 1 y 4} \\ j < J(t) & \text{en cuadrantes 2 y 3} \end{cases}$$

donde $I(t)$, $J(t)$ son las coordenadas del centro de activación global y se calcularon mediante la ecuación (12).

3.3.6.4. Análisis estadístico

Para comparar la amplitud y latencia de las respuestas a estimulación de las extremidades contralaterales anteriores y posteriores a baja y alta intensidad, se empleó una ANOVA mixta de dos factores, donde la extremidad era el primer factor con dos niveles de medidas repetidas (extremidad anterior y extremidad posterior), y la intensidad de estimulación era el segundo factor con dos niveles de medidas independientes (baja y alta intensidad). La razón por la que se consideraron medidas independientes fue porque no todas las ratas recibieron las dos intensidades de estimulación. Para comparar las amplitudes y latencias de las respuestas a estimulación de las extremidades ipsilaterales y contralaterales, se usó una ANOVA de dos factores de medidas independientes, donde la extremidad era el primer factor con dos niveles

(extremidad anterior y extremidad posterior) y el lado corporal era el segundo factor con dos niveles (contralateral e ipsilateral). Esta comparación se realizó solo con respuestas a estímulos de alta intensidad ya que las respuestas ipsilaterales a estímulos de baja intensidad no eran fácilmente detectadas.

Para evaluar la extensión de las respuestas somatosensoriales corticales, se compararon el área máxima activada y la velocidad de activación máxima de las respuestas a estimulación a alta y baja intensidad de las extremidades anterior y posterior. Esta comparación se realizó con una ANOVA mixta de dos factores, donde la extremidad era el primer factor con dos niveles de medidas repetidas (extremidad anterior y extremidad posterior) y la intensidad de estimulación era el segundo factor con dos niveles de medidas independientes (alta y baja intensidad). El solapamiento cortical entre el área máxima activada por estimulación de las extremidades anterior y posterior a alta y baja intensidad, se comparó usando un *t*-test no pareado. La amplitud y latencia de las respuestas en la región cortical correspondiente a la extremidad estimulada (extremidad anterior o posterior contralateral) se compararon con las respuestas en la región cortical correspondiente a la extremidad no estimulada (extremidad posterior o anterior contralateral) usando un *t*-test pareado. Esta comparación se realizó solo con respuestas a estímulos de alta intensidad debido a que las respuestas en la región cortical correspondiente a la extremidad no estimulada eran mucho menos observables a baja intensidad. La velocidad lineal de activación desde corteza de la extremidad anterior a la corteza de la extremidad posterior se comparó con la velocidad lineal de activación desde corteza de la extremidad posterior a la corteza de la extremidad anterior usando un *t*-test no pareado.

Para estudiar la direccionalidad de las respuestas somatosensoriales corticales, se determinó si había movimiento del centro de activación global comparando las coordenadas de dicho centro de activación en el instante en que el área alcanzaba el máximo valor con las correspondientes coordenadas en el instante inicial usando un *t*-test pareado. Esto se realizó separadamente para las direcciones medial-lateral y anterior-posterior en las respuestas de la corteza de la extremidad anterior y posterior a estimulación de alta intensidad.

Todos los datos se transformaron logarítmicamente para el análisis estadístico. Todos los resultados se dan como media \pm desviación estándar y se consideraron significativos a $p < 0.05$.

4. RESULTADOS

4.1. ESTUDIO FISIOLÓGICO EN TÁLAMO SOMATOSENSORIAL

4.1.1. Análisis fisiológico

4.1.1.1. Respuestas al estímulo ON

De los registros electrofisiológicos en el tálamo somatosensorial en respuesta a estímulos táctiles, se pudieron extraer un total de 41 neuronas individuales bien discriminadas. La tasa de disparo espontáneo de las neuronas calculada inmediatamente antes de los estímulos ON fue 1.9 ± 2.8 Hz y no fue significativamente diferente (*t*-test no pareado, $p = 0.33$) entre neuronas registradas bajo pentobarbital ($n = 22$) y neuronas registradas bajo uretano ($n = 19$). Casi todas las neuronas (39 de 41) se excitaron con estímulos ON (Figura 4.1). Las magnitudes y latencias de las respuestas se muestran en la Tabla 1. Las magnitudes de las respuestas fueron similares entre neuronas de las vibrisas, neuronas de la extremidad anterior y neuronas de la extremidad posterior (ANOVA, $p = 0.32$), pero fueron mayores en neuronas registradas bajo pentobarbital (1.81 ± 0.89 espigas/estímulo) que en neuronas registradas bajo uretano (1.21 ± 0.52 espigas/estímulo; ANOVA, $p = 0.0393$). Las latencias de las respuestas en neuronas de las vibrisas fueron menores que en neuronas de la extremidad anterior, y fueron menores en neuronas de la extremidad anterior que en neuronas de la extremidad posterior (ANOVA, $p = 0.00002$), lo cual es consistente con las diferencias esperadas en el tiempo requerido para alcanzar el tronco del encéfalo desde los diferentes lugares de estimulación. Las latencias de las respuestas a los estímulos ON no diferían entre neuronas registrada bajo pentobarbital y neuronas registradas bajo uretano (ANOVA, $p = 0.89$).

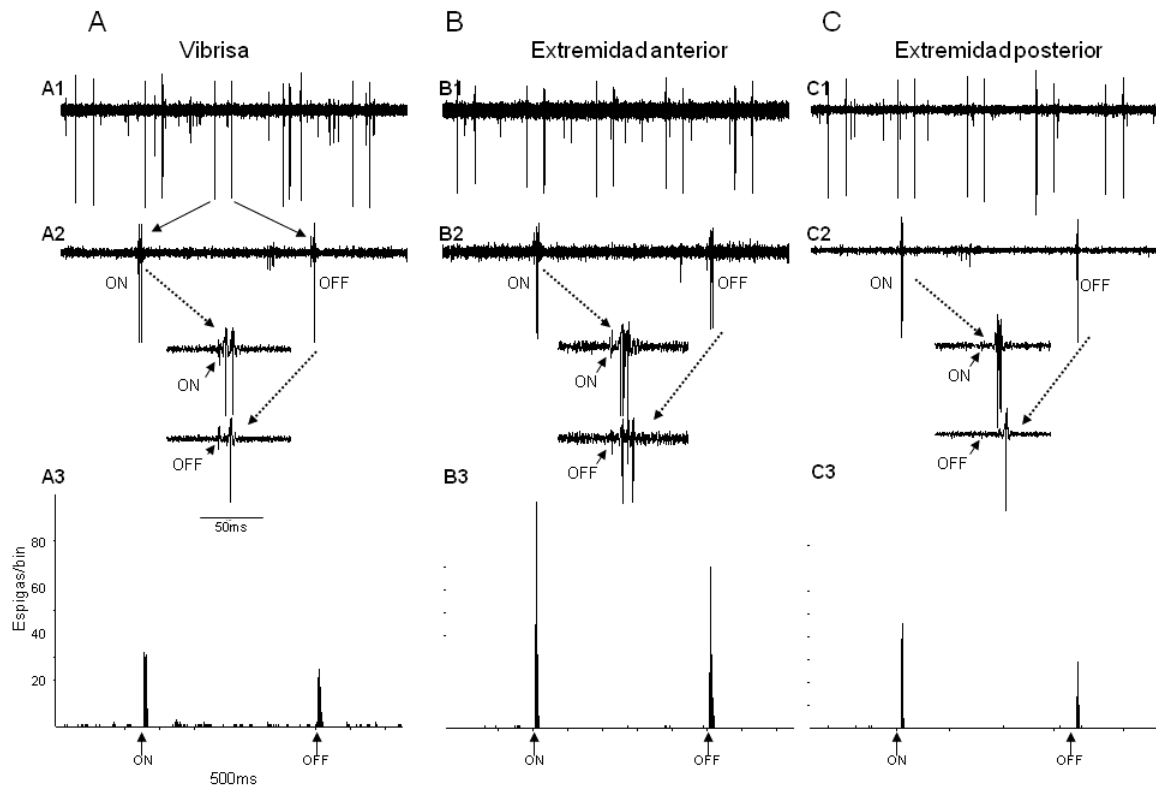


Figura 4.1. Comparación de las respuestas ON-OFF en el complejo ventrobasal. (A) Neurona representativa del núcleo ventral-posterior-medial (VPM) respondiendo a deflexión de su vibrisa principal. (B) Neurona representativa de la extremidad anterior en el núcleo ventral-posterior-lateral (VPL) respondiendo a estimulación táctil del centro de su campo receptor. (C) Neurona representativa de la extremidad posterior en el núcleo VPL respondiendo a estimulación táctil del centro de su campo receptor. La parte superior de la figura (A1, B1, C1) muestra 10 s de registro continuo, la parte central (A2, B2, C2) presenta registros de 1s con respuestas a un estímulo ON-OFF de 500 ms de duración y la parte inferior (A3, B3, C3) muestra los correspondientes histogramas de tiempo peri-estímulo realizados con 100 estímulos.

4.1.1.2. Respuestas al estímulo OFF

La tasa de disparo espontáneo de las neuronas calculada inmediatamente antes de los estímulos OFF fue 2.8 ± 3.2 Hz y no fue significativamente diferente entre neuronas registradas bajo pentobarbital y neuronas registradas bajo uretano (*t*-test no pareado, $p = 0.27$). La mayoría de las neuronas (32 de 39) fueron excitadas por estímulos OFF (Figura 4.1). Las magnitudes y latencias de las respuestas se muestran en la Tabla 1. De nuevo, las magnitudes de las respuestas a los estímulos OFF fueron similares entre neuronas de la extremidad anterior, posterior y vibrisa (ANOVA, $p = 0.99$). Las magnitudes de respuesta tendían a ser mayores en neuronas registradas bajo

pentobarbital, pero la diferencia no fue estadísticamente significativa (ANOVA, $p = 0.14$). De igual manera para las latencias de las respuestas a estímulos ON, las latencias de las respuestas a los estímulos OFF en neuronas de las vibrisas fueron menores que en neuronas de la extremidad anterior, y fueron menores en neuronas de la extremidad anterior que en neuronas de la extremidad posterior (ANOVA, $p = 0.00002$). Las latencias de las respuestas a los estímulos OFF tendían a ser mayores bajo pentobarbital que bajo uretano, pero de nuevo, la diferencia no alcanzó la significancia (ANOVA, $p = 0.0764$).

Tabla 1. Resumen de las magnitudes y latencias de las respuestas de neuronas tálamo-corticales a estímulos ON, OFF e impulsivo

| | Magnitud de respuesta (espigas/estímulo) | Latencia de respuesta (ms) |
|-----------------------------|---|-------------------------------|
| ON | | |
| Extremidad posterior (n=15) | 1.63 ± 0.61 | 11.0 ± 2.3 |
| Extremidad anterior (n=16) | 1.60 ± 1.00 | 7.1 ± 1.6 |
| Vibrisa (n=8) | 1.17 ± 0.54 | 4.6 ± 0.9 |
| Todas (n=39) | 1.52 ± 0.79 | 8.1 ± 3.0 |
| OFF | | |
| Extremidad posterior (n=12) | 1.47 ± 1.23 | 14.1 ± 3.9 |
| Extremidad anterior (n=13) | 1.25 ± 0.77 | 9.1 ± 3.1 |
| Vibrisa (n=7) | 1.18 ± 0.59 | 5.1 ± 1.7 |
| Todas (n=32) | 1.32 ± 0.92 | 10.1 ± 4.7 |
| IMPULSIVO | | |
| Extremidad posterior (n=13) | 1.61 ± 0.57 | 11.2 ± 2.3 |
| Extremidad anterior (n=11) | 1.38 ± 0.59 | 6.8 ± 1.5 |
| Vibrisa (n=8) | 1.18 ± 0.56 | 4.5 ± 0.9 |
| Todas (n=32) | 1.43 ± 0.58 | 8.0 ± 3.3 |

Los valores son dados como media \pm desviación estándar

4.1.1.3. Índice de sintonía ON-OFF

En general, el 66 % de las neuronas mostraron una mayor sintonía con los estímulos ON, y el restante 33 % (13 de 39) mostraron mayor sintonía con los estímulos OFF. Se encontró que las neuronas con mayor sintonía al estímulo OFF estaban distribuidas por todo el complejo ventrobasal: 5 de las 15 neuronas correspondientes a la extremidad posterior, 4 de las 16 neuronas correspondientes a la extremidad anterior y 4 de las 8 neuronas

correspondientes a las vibrisas. Análisis estadísticos mostraron que el índice de sintonía ON-OFF se distribuía de forma similar en neuronas registradas bajo pentobarbital (0.66 ± 0.26) que en neuronas registradas bajo uretano (0.62 ± 0.22) (ANOVA, $p = 0.70$) y fue similar para neuronas de las extremidades posteriores (0.68 ± 0.24), neuronas de las extremidades anteriores (0.64 ± 0.24) y neuronas de las vibrisas (0.56 ± 0.21) registradas en el complejo ventrobasal (ANOVA, $p = 0.35$).

4.1.1.4. Comparación entre respuestas ON y respuestas OFF

La tasa de disparo espontáneo calculado inmediatamente antes de los estímulos OFF fue significativamente mayor que la tasa de disparo espontáneo calculado inmediatamente antes de los estímulos ON (t -test pareado, $p = 0.0025$). Cuando se compararon las respuestas OFF y las respuestas ON, las magnitudes de respuestas no fueron significativamente diferentes entre los estímulos ON y OFF (t -test pareado, $p = 0.30$), mientras que las latencias de las respuestas a los estímulos OFF fueron significativamente mayores que en respuesta a los estímulos ON (t -test pareado, $p = 0.00002$) (Figura 4.1) tanto bajo pentobarbital (t -test pareado, $p = 0.0004$), como bajo uretano (t -test pareado, $p = 0.0035$). La diferencia entre la latencia de las respuestas OFF y la latencia de las respuestas ON fue más evidente bajo pentobarbital (3.6 ± 2.8 ms) que bajo uretano (1.0 ± 1.1 ms; t -test pareado, $p = 0.0158$).

Las magnitudes de las respuestas a los estímulos OFF y a los estímulos ON presentaron una débil pero significativa correlación (Pearson, $r = 0.43$, $p = 0.0138$). Las latencias de las respuestas a los estímulos OFF y a los estímulos ON estaban fuertemente correlacionadas ($r = 0.88$, $p < 0.000001$), tanto bajo pentobarbital ($r = 0.86$, $p = 0.00002$) como bajo uretano ($r = 0.95$, $p < 0.000001$). La correlación entre las latencias a los estímulos ON y OFF fue consistente para neuronas de la extremidad posterior ($r = 0.75$, $p = 0.0046$), neuronas de la extremidad anterior ($r = 0.61$, $p = 0.0271$) y neuronas de las vibrisas ($r = 0.96$, $p = 0.0006$) (Figura 4.2 A).

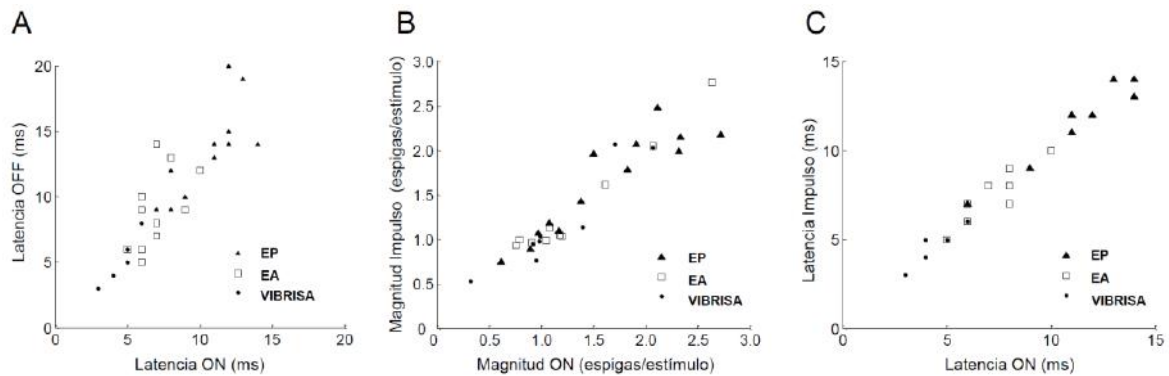


Figura 4.2. Correlaciones entre las respuestas ON, respuestas OFF y respuestas impulsivas. (A) Correlación entre la latencia de las respuestas ON (eje x) y la latencia de las respuestas OFF (eje y). (B) Correlación entre la magnitud de las respuestas ON (eje x) y la magnitud de las respuestas impulsivas (eje y). (C) Correlación entre la latencia de las respuestas ON (eje x) y la latencia de las respuestas impulsivas (eje y). Nótese que el número total de puntos en las gráficas es menor que el número total de neuronas debido a algunas neuronas tenían idénticas latencias o magnitudes. Los triángulos corresponden a la extremidad posterior (EP), los cuadrados a las extremidad anterior (EA) y los círculos a las vibrisas.

4.1.1.5. Respuestas al estímulo impulsivo

En un grupo de 32 neuronas, se estudió también las respuestas a estímulos impulsivos. Todas las neuronas respondieron a este estímulo. Las magnitudes y latencias de las respuestas se muestran en la Tabla 1. Los análisis de las respuestas impulsivas confirmaron los resultados obtenidos con las respuestas ON. Las magnitudes de las respuestas fueron similares entre neuronas de la extremidad posterior, neuronas de la extremidad anterior y neuronas de las vibrisas (ANOVA, $p = 0.23$) pero fueron mayores en neuronas registradas bajo pentobarbital (1.71 ± 0.58 espigas/estímulo) que en neuronas registradas bajo uretano (1.23 ± 0.52 espigas/estímulo; ANOVA, $p = 0.0316$). Las latencias de las respuestas fueron menores en neuronas de las vibrisas que en neuronas de la extremidad anterior, y menores en neuronas de la extremidad anterior que en neuronas de la extremidad posterior (ANOVA, $p < 0.00001$). Las latencias de las respuestas no difirieron entre neuronas registradas bajo pentobarbital y neuronas registradas bajo uretano (ANOVA, $p = 0.49$).

4.1.1.6. Comparación entre respuestas impulsivas y respuestas ON-OFF

La tasa de disparo espontáneo calculado inmediatamente antes de los estímulos impulsivos no fue diferente de la tasa de disparo espontánea calculado inmediatamente antes de los estímulos ON (t -test pareado, $p = 0.96$). La comparación entre las respuestas impulsivas y las respuestas ON-OFF revelaron que las magnitudes medias de las respuestas a los estímulos impulsivos fueron mucho más pequeñas que la suma de las magnitudes de las respuestas a los estímulos ON y los estímulos OFF (t -test pareado, $p < 0.00001$), siendo de hecho notablemente similar a las magnitudes de respuesta a los estímulos ON solos (t -test pareado, $p = 0.44$). Además, las magnitudes de las respuestas a los estímulos impulsivos correlacionaron bien con las magnitudes de las respuestas a los estímulos ON (Pearson, $r = 0.76$, $p < 0.00001$). Esto fue cierto para neuronas de la extremidad posterior ($r = 0.91$, $p = 0.00001$), para neuronas de la extremidad anterior ($r = 0.64$, $p = 0.0342$), y para neuronas de las vibrisas ($r = 0.94$, $p = 0.0006$) (Figura 4.2 B). Esta estrecha relación entre los estímulos impulsivos y los estímulos ON fue corroborada por la fuerte correlación entre las latencias de sus respuestas (Pearson, $r = 0.98$, $p < 0.00001$). De nuevo, esto se verificó para neuronas de la extremidad anterior ($r = 0.94$, $p < 0.00001$), para neuronas de la extremidad posterior ($r = 0.93$, $p = 0.00004$), y para neuronas de las vibrisas ($r = 0.93$, $p = 0.0009$) (Figura 4.2 C).

Las magnitudes de las respuestas a los estímulos impulsivos también correlacionaron débilmente con las magnitudes de respuesta a los estímulos OFF (Pearson, $r = 0.37$, $p = 0.0388$), lo cual, reveló una relación más sutil entre las respuestas impulsivas y las respuestas OFF. Se encontró que en seis de seis neuronas que no respondieron a los estímulos OFF (extremidad posterior, $n = 3$; extremidad anterior, $n = 2$; vibrisa, $n = 1$), las magnitudes de las respuestas a los estímulos impulsivos fueron menores que las magnitudes de respuesta a los estímulos ON (Figura 4.3 A), con una diferencia de 0.62 ± 1.16 espigas/estímulo (Wilcoxon pareado, $p = 0.0313$). Por el contrario, en todas las neuronas restantes, las magnitudes de las respuestas a los estímulos

impulsivos fueron, en promedio, ligeramente mayores que las magnitudes de las respuestas a los estímulos ON (Figura 4.3 B), con una diferencia de 0.05 ± 0.20 espigas/estímulo (*t*-test pareado de una cola, $p = 0.0375$). En general, la relación entre las magnitudes de respuesta a los estímulos impulsivos y las magnitudes de respuesta a los estímulos ON estaba negativamente correlacionado con el índice de sintonía ON-OFF (Pearson, $r = -0.47$, $p = 0.0057$). Esto significa que las neuronas que respondieron poco o nada a los estímulos OFF (índice de sintonía ON-OFF próxima a 1) respondieron más a los estímulos ON que a los estímulos impulsivos, mientras que las neuronas que presentaron respuesta predominante a los estímulos OFF (sintonía ON-OFF próxima a 0) respondieron igual o incluso más a los estímulos impulsivos que a los estímulos ON (Figura 4.3).

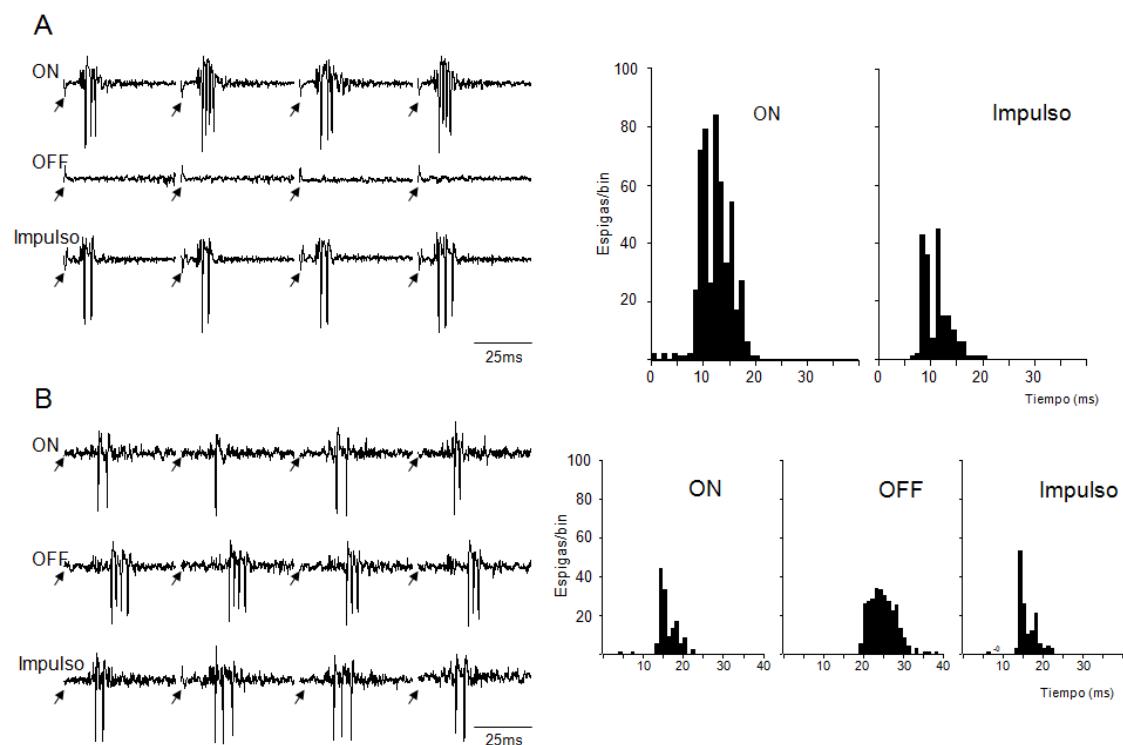


Figura 4.3. Respuestas ON-OFF y respuestas impulsivas. (A) Neurona talamocortical representativa presentando fuerte respuesta ON, ninguna respuesta OFF y una respuesta impulsiva menor que la respuesta ON. (B) Neurona talamocortical representativa presentando una débil respuesta ON, fuerte respuesta OFF y respuesta impulsiva mayor que la respuesta ON. En la parte derecha de la figura se representan los correspondientes histogramas de tiempo peri-estímulo realizados con 100 estímulos. Las neuronas en A y B fueron registradas, respectivamente, desde las representaciones de la extremidad posterior y anterior del complejo ventrobasal.

4.1.1.7. Estructura espacial de las respuestas ON-OFF

En un grupo de células (extremidad posterior, $n = 4$; extremidad anterior, $n = 7$; vibrisas, $n = 1$), se registraron las respuestas a los estímulos ON y OFF aplicados en un campo receptor secundario (una vibrisa o dígito adyacente). Como se esperaba, las magnitudes de las respuestas a los estímulos ON disminuían significativa y consistentemente cuando el estímulo se movía del campo receptor principal al campo receptor secundario (t -test pareado, $p = 0.0007$). Por el contrario, la magnitud media de las respuestas a los estímulos OFF no cambiaba significativamente cuando el estímulo se movía del campo receptor principal al campo receptor secundario ($p = 0.94$). Consecuentemente,

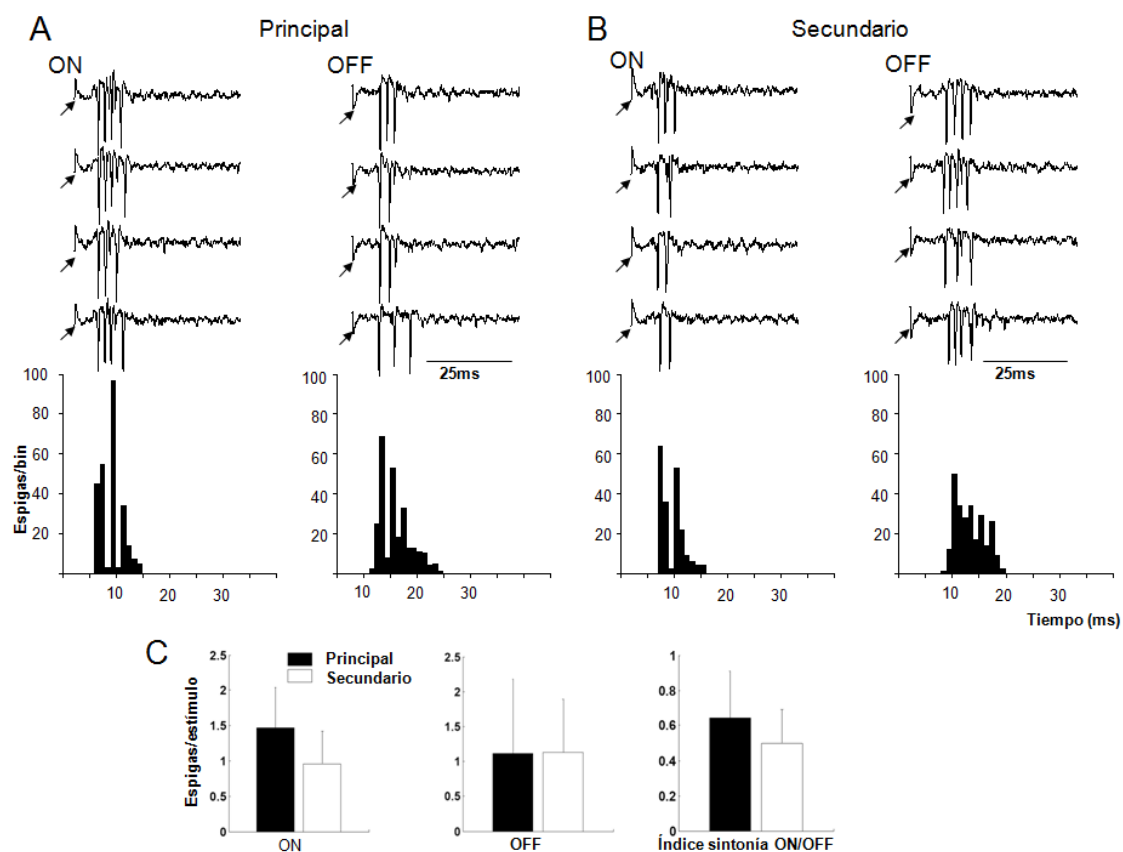


Figura 4.4. Estructura espacial de las respuestas ON-OFF. (A) Neurona talamocortical representativa de la extremidad anterior presentando respuestas ON y OFF en el centro de su campo receptor (campo receptor principal). (B) Cuando el estímulo se movía a un campo receptor secundario, la neurona presentaba menores respuestas ON pero mayores respuestas OFF. La parte superior de la figura muestra trazas o registros individuales, y la parte inferior muestra los correspondientes histogramas de tiempo peri-estímulo realizados con 100 estímulos. (C) Diagrama de barras mostrando valores poblacionales para las respuestas ON (izquierda), respuestas OFF (centro) e índice de sintonía ON-OFF (derecha). Las barras de error representan desviaciones estándar.

el índice de sintonía ON-OFF decrecía significativamente cuando el estímulo se movía del campo receptor principal al campo receptor secundario (t -test pareado de una cola, $p = 0.0280$) (Figura 4.4).

4.1.2. Análisis de información

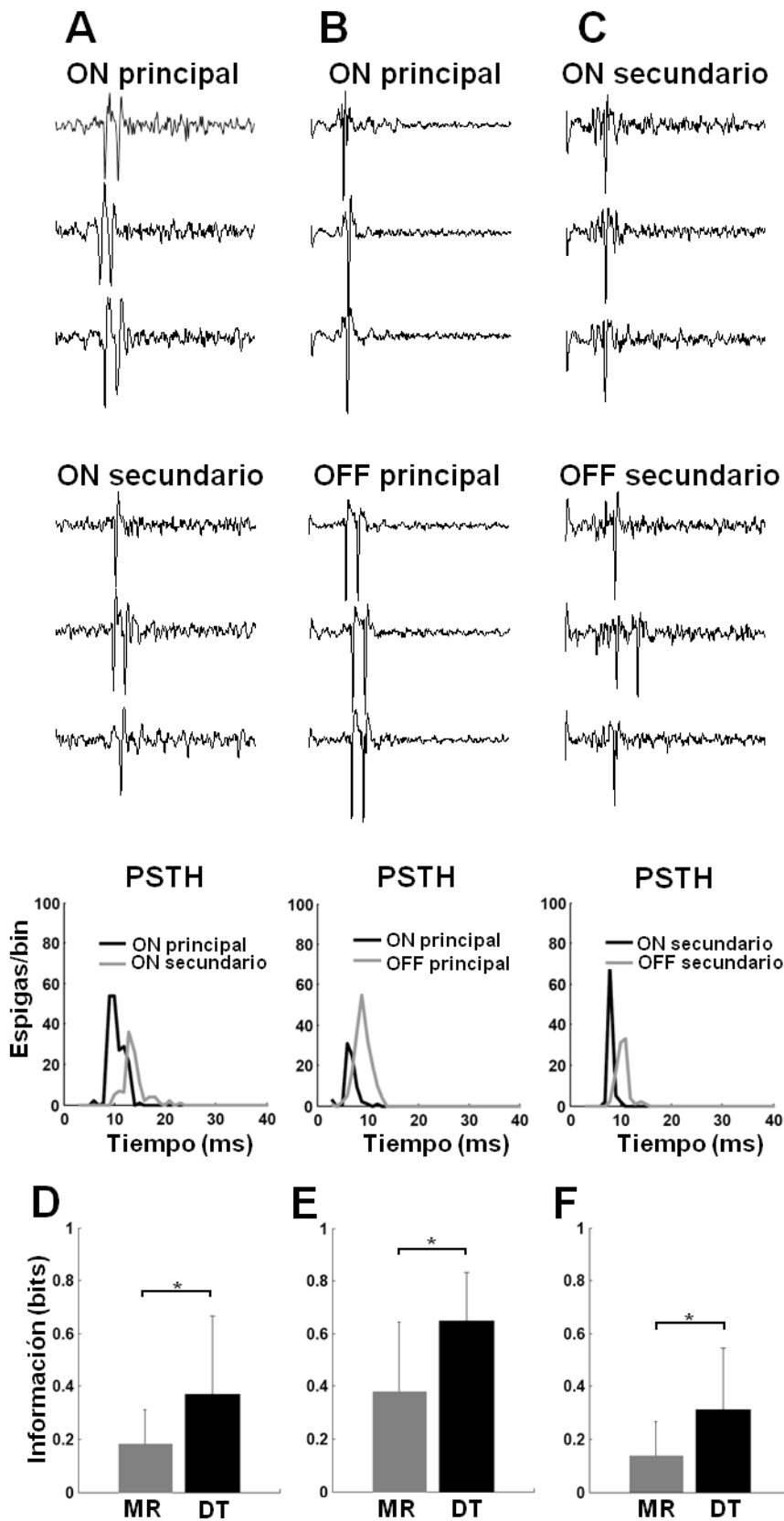
4.1.2.1. Información extraída de la distribución temporal de las respuestas

Se analizó un grupo de las 11 neuronas bien discriminadas del VPL que respondían a los estímulos ON y OFF aplicados en dos localizaciones diferentes: en el campo receptor principal (por ejemplo, un dedo) y en el campo receptor secundario excitador (por ejemplo, un dedo adyacente). Como modelo de discriminación de la localización del estímulo, se usaron las respuestas al estímulo ON para discriminar entre los estímulos aplicados en el campo receptor principal y los estímulos aplicados en el campo receptor secundario excitador (Figura 4.5 A, D). Usando la magnitud de respuesta se obtuvieron 0.18 ± 0.13 bits de información, mientras que usando la distribución temporal se obtuvieron 0.37 ± 0.30 bits, que es un 106 % más de información que la obtenida usando la magnitud. Como modelo de discriminación de la dinámica del estímulo, se discriminó entre los estímulos ON y OFF aplicados en el campo receptor principal (Figura 4.5 B, E). Usando la magnitud de respuesta se obtuvieron 0.38 ± 0.27 bits de información, mientras que usando la distribución temporal se obtuvieron 0.65 ± 0.18 bits, que es un 71 % más de información que la obtenida usando la magnitud. También se discriminó entre los estímulos ON y OFF aplicados en el campo receptor secundario excitador (Figura 4.5 C, F). Usando la magnitud de respuesta se obtuvieron 0.14 ± 0.13 bits de información, mientras que usando la distribución temporal se obtuvieron 0.31 ± 0.23 bits, que es un 121 % más de información que la obtenida usando la magnitud. Una ANOVA de dos factores de medidas repetidas, confirmó que la información obtenida de la distribución temporal era significativamente mayor que la información obtenida de la magnitud de las respuestas en los tres

problemas de discriminación planteados anteriormente (primer factor: magnitud vs. distribución temporal de la respuesta: $p = 0.0055$; segundo factor: problema de discriminación: $p = 0.0006$, interacción $p = 0.38$). Para corroborar que los resultados no eran específicos de la discriminación binaria, se discriminó entre los cuatro estímulos: estímulos ON aplicados en el campo receptor principal, estímulos ON aplicados en el campo receptor secundario, estímulos OFF aplicados en el campo receptor principal y estímulos OFF aplicados en el campo receptor secundario. Usando la magnitud de respuesta se obtuvieron 0.34 ± 0.20 bits de información. Usando la distribución temporal se obtuvieron 0.78 ± 0.29 bits de información, que es un 129 % más de información que la obtenida con la magnitud (t -test pareado, $p = 0.0017$).

4.1.2.2. Información extraída de la magnitud de las respuestas, información extraída de la distribución temporal de las respuestas e información temporal

Las respuestas neuronales dividida en bins, usadas para investigar el papel de la distribución temporal de las respuestas, cuantifican cuántas espigas ocurrieron (información extraída de la magnitud de las respuestas) y cuándo ocurrieron (información extraída de la distribución temporal de las respuestas). Consideremos dos neuronas representativas (Figura 4.6). Una neurona respondió a los dos estímulos (ON y OFF) con diferentes magnitudes y diferentes latencias (Figura 4.6 A). La otra neurona respondió a los dos estímulos con similares magnitudes y diferentes latencias (Figura 4.6 B). En la primera neurona, cuyas magnitudes de respuesta a los dos estímulos fueron diferentes (1.4 vs. 3.1 espigas/estímulo), la distribución temporal no proporcionó información adicional sobre la proporcionada por la magnitud de respuesta, aunque la diferencia de latencia podía claramente discriminar entre los dos estímulos. En este caso, por el contrario, en la segunda neurona, cuyas magnitudes de respuesta a los dos estímulos fueron similares (1.1 vs. 1.3 espigas/estímulo), la distribución temporal proporcionó aproximadamente 10 veces más información que la magnitud de respuesta. En este caso, casi toda



la información extraída de la distribución temporal fue información temporal aportada por las diferencias de latencia. En general, decir que usando la distribución temporal de las respuestas se puede extraer más información que usando la magnitud de las mismas significa que en las respuestas hay algo de información temporal que es independiente de la información aportada por la magnitud de las respuestas, pero no significa necesariamente que la información temporal sola sea mayor que la información aportada por la magnitud de las respuestas.

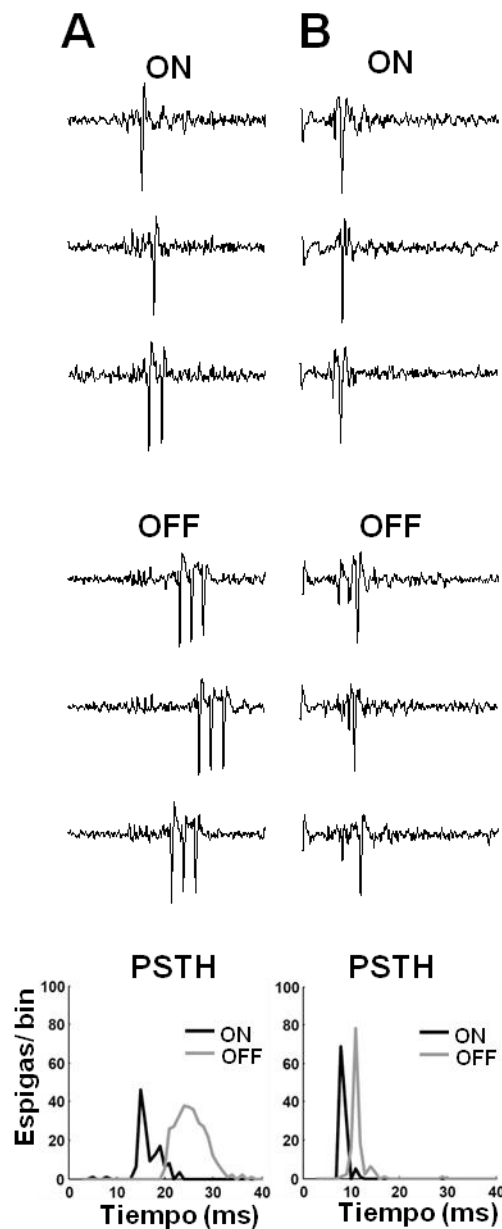


Figura 4.6. Información extraída de la distribución temporal de la respuesta, información extraída de la magnitud de la respuesta e información temporal. (A, B) Neuronas representativas respondiendo a estímulos ON y OFF con diferentes (A) y similares (B) magnitudes de respuesta. Distribución como en la figura 4.5 A-C. (C) Gráfico de dispersión de la información extraída de la magnitud de respuesta y la información extraída de la distribución temporal de la respuesta para el total de 39 neuronas que responden a los estímulos ON y OFF aplicados en el campo receptor principal. Los símbolos vacíos representan neuronas que presentan alta diferencia de magnitud entre las respuestas a los dos estímulos ($n = 26$); los símbolos rellenos representan neuronas que presentan baja diferencia de magnitud ($n = 13$). En la mayoría de las neuronas que presentan alta diferencia de magnitud no es posible desambiguar la información temporal de la información extraída de la magnitud de respuesta. En la mayoría de las neuronas que presentan una baja diferencia de magnitud, la mayor parte de la información extraída de la distribución puede ser considerada sin ambigüedad información temporal.

Para testar si en nuestros datos experimentales la información temporal sola era mayor que la información extraída de las magnitudes de respuesta, se realizaron dos análisis. En el **primer análisis**, se consideró solo la primera espiga de la respuesta a cada prueba y solo se utilizaron las pruebas en las que se produjo respuesta (es decir, pruebas con espigas). En esta condición la magnitud de respuesta no aporta información, por lo que, toda la información extraída de la distribución temporal es información temporal. De forma que se investigó la información que conllevaban las primeras espigas de las pruebas con respuesta en el mismo subgrupo de 11 neuronas que respondían a los estímulos ON y OFF aplicados en el campo receptor principal y en un campo receptor secundario excitador. De nuevo, primero se usaron las respuestas al estímulo ON para discriminar entre estímulos en el campo receptor principal y estímulos en el campo receptor secundario. Usando la magnitud de la respuesta, considerando todas las espigas de las pruebas con respuesta, se obtuvieron 0.12 ± 0.11 bits de información. Usando la distribución temporal con solo las primeras espigas de las pruebas con respuesta se obtuvieron 0.26 ± 0.24 bits de información. Así, la información temporal sola en promedio fue al menos un 116 % mayor que la información extraída de la magnitud de respuesta. A continuación, se discriminó entre los estímulos ON y OFF aplicados en el campo receptor principal. Usando la magnitud de la respuesta, considerando todas las espigas de las pruebas con respuesta, se obtuvieron 0.20 ± 0.16 bits de información. Usando la distribución temporal con solo las primeras espigas de las pruebas con respuesta se obtuvieron 0.53 ± 0.27 bits de información. De modo que, la información temporal sola en promedio fue al menos un 165 % mayor que la información extraída de la magnitud de respuesta. Finalmente, se discriminó entre los estímulos ON y OFF aplicados en el campo receptor secundario excitador. Usando la magnitud de la respuesta, considerando todas las espigas de las pruebas con respuesta, se obtuvieron 0.09 ± 0.10 bits de información. Usando la distribución temporal con solo las primeras espigas de las pruebas con respuesta se obtuvieron 0.40 ± 0.29 bits de información. Así, la información temporal sola en promedio fue al menos un 344 % mayor que la información extraída de la magnitud de

respuesta. Una ANOVA de dos factores con medidas repetidas confirmó que en pruebas con respuesta, la información temporal fue significativamente mayor que la información de la magnitud de respuesta en los tres problemas de discriminación descritos arriba (primer factor: magnitud de respuesta vs. distribución temporal: $p = 0.0028$; segundo factor: problema de discriminación: $p = 0.0136$; interacción, $p = 0.24$).

En el **segundo análisis** se seleccionaron las neuronas que presentaron magnitudes de respuesta similares a los dos estímulos. En esta condición, se esperaba que la información extraída de la magnitud de respuesta fuese muy pequeña, de forma que, la mayor parte de la información extraída de la distribución temporal podía ser considerada sin ambigüedad, información temporal. Se investigó esta idea en un grupo de 39 neuronas tálamo-corticales que respondieron a los estímulos ON y OFF aplicados en su campo receptor principal. Se clasificaron las 39 neuronas en dos grupos: un grupo compuesto por las neuronas que presentaron alta diferencia de magnitud entre las respuestas a los dos estímulos (1.1 ± 0.9 espigas/estímulo, $n = 26$ neuronas), como la neurona mostrada en la figura 4.6 A; y otro grupo compuesto por las neuronas que presentaron una diferencia de magnitud pequeña (0.4 ± 0.3 espigas/estímulo, $n = 13$ neuronas) como la neurona mostrada en la figura 4.6 B (Tabla 2). Se encontró que en aquellas neuronas que respondieron a los dos estímulos con diferentes magnitudes, la información extraída de la magnitud de respuesta (0.43 ± 0.27 bits) fue similar a la información extraída de la distribución temporal (0.44 ± 0.25 bits, t -test pareado: $p = 0.4514$). En algunas neuronas considerar la distribución temporal de las respuestas no proporcionó información adicional sobre la obtenida considerando solo la magnitud, pero en otras neuronas la información obtenida de la distribución temporal fue menor que la información extraída de la magnitud debido una subestimación (Figura 4.6 C). En general, en este grupo no fue posible desambiguar la información temporal de la información de magnitud de respuesta. Por el contrario, en neuronas que respondieron a los dos estímulos con magnitudes similares, la información extraída de la distribución temporal (0.57 ± 0.20 bits) fue bastante superior a la extraída desde la magnitud de respuesta (0.14 ± 0.10 bits, t -test

pareado: $p = 0.000004$). En este grupo la información adicional aportada por la distribución temporal, lo cual representa una estima conservativa de la información temporal, fue un 207 % mayor que la aportada por la magnitud de la respuesta.

Tabla 2. Propiedades neurofisiológicas de neuronas respondiendo a estímulos ON y OFF

| | Neuronas con alta diferencia de magnitud entre estímulos (n=26) | | Neuronas con baja diferencia de magnitud entre estímulos (n=13) | |
|---|---|-----------------|---|-----------------|
| | ON | OFF | ON | OFF |
| Magnitud de respuesta (espigas/estímulo) | 1.49 ± 0.89 | 1.07 ± 1.11 | 1.60 ± 0.51 | 1.27 ± 0.59 |
| Rango | 0.32 - 4.79 | 0.00-3.37 | 0.90 - 2.64 | 0.64 - 2.65 |
| Actividad pre-estímulo (Hz) | 2.2 ± 3.4 | 4.7 ± 4.9 | 1.0 ± 1.6 | 1.2 ± 1.3 |
| % de primeras espigas | 67 ± 21 | 50 ± 28 | 65 ± 21 | 70 ± 21 |
| Latencia de primeras espigas (ms) | 10.3 ± 3.5 | 14.6 ± 6.0 | 9.2 ± 2.6 | 13.3 ± 4.7 |
| Jitter de primeras espigas (ms) | 1.7 ± 1.2 | 4.3 ± 3.7 | 1.0 ± 0.8 | 2.4 ± 1.4 |

(Las magnitudes de respuestas se calcularon como número medio de espigas por estímulo en la misma ventana post-estímulo de 40 ms usada en los análisis de información. La actividad pre-estímulo (expresada en Hz) se calculó en una ventana de 40 ms pre-estímulo. Los % de primeras espigas se calcularon como el porcentaje de espigas que son primeras espigas en las respuestas a las pruebas individuales. Las latencias y jitters de las primeras espigas también son incluidas)

Para corroborar la relación entre información temporal y primeras espigas, en el mismo grupo de 39 neuronas en las que los estímulos ON y OFF se aplicaron en el campo receptor principal, desde la distribución temporal se calculó la información aportada por la primera espiga de la respuesta a cada prueba. En las 26 neuronas que respondieron a los dos estímulos con diferentes magnitudes, la primera espiga aportó 0.38 ± 0.24 bits de información, que correspondió a un 86 % de la información aportada por todas las espigas. En las 13 neuronas que respondieron a los dos estímulos con magnitudes similares, la primera espiga aportó 0.55 ± 0.18 bits de información, que correspondió a un 97 % de la información aportada por todas las espigas. En esas 13 neuronas, las primeras espigas representaron un 65% de las espigas

de las respuestas al estímulo ON, y un 70 % de las espigas de la respuesta al estímulo OFF, lo que significa, que el restante 30 y 35 % de las espigas proporcionaron poca información adicional a la aportada por las primeras espigas (véase apartado 4.1.2.3). Por tanto, cuando la magnitud de la respuesta a los dos estímulos eran similar, las primeras espigas aportaban prácticamente toda la información temporal.

En conjunto, esos resultados sugieren que la información temporal sola puede ser mayor que la información de la magnitud, y soportan la idea de que las primeras espigas representan la base de la información temporal en el complejo ventrobasal de la rata.

4.1.2.3. Primera espiga vs. segunda espiga de las respuestas

Se analizaron las respuestas a los estímulos ON y OFF aplicados sobre el campo receptor principal en el subgrupo de 13 neuronas para las que las magnitudes de respuestas a los dos estímulos fueron similares. La probabilidad media de que una neurona respondiese al estímulo ON con más de una espiga fue 0.47 ± 0.33 y la probabilidad de que lo hiciese al estímulo OFF fue 0.32 ± 0.30 . La latencia de las segundas espigas de las respuestas fue 12.65 ± 4.21 ms para los estímulos ON y 16.25 ± 5.75 ms para los estímulos OFF. El intervalo entre la primera y la segunda espiga de las respuestas fue 3.42 ± 2.21 ms para los estímulos ON y 3.92 ± 2.87 ms para los estímulos OFF.

Se calculó también la información extraída de la distribución temporal a cerca de la discriminación entre los estímulos ON y OFF aplicados en el campo receptor principal, usando únicamente las segundas espigas. Se obtuvieron 0.23 ± 0.23 bits de información, que correspondió a un 40% de la información obtenida considerando todas las espigas de las respuestas. Dado que la primera espiga aportó el 97% de la información total aportada por todas las espigas (ver apartado anterior), la mayor parte de la información contenida en la segunda espiga de la respuesta es, por tanto, información redundante a la información contenida en las primeras espigas.

4.1.2.4. Contribución de la latencia de las primeras espigas y de los jitters a la información

Con el fin de investigar la naturaleza de la información temporal, se realizaron una serie de experimentos computacionales sobre las 13 neuronas que respondieron con magnitudes similares a los estímulos ON y OFF aplicados en el campo receptor principal, usando la primera espiga de la respuesta en cada prueba. Debido a que las primeras espigas pueden ser caracterizadas en términos de latencias y jitters, se modularon tres parámetros principales de las respuestas a dichos estímulos: (1) la diferencia de latencia entre estímulos (Figura 4.7 A), (2) el jitter total de las respuestas (Figura 4.7 B), y (3) la diferencia de jitter entre estímulos (Figura 4.7 C). La razón de esas simulaciones es que permiten explorar un amplio rango de parámetros de respuesta que están disponibles en la variabilidad fisiológica.

La **primera idea** que se testó fue que la información temporal surge de las diferencias de latencia entre las respuestas a los diferentes estímulos. Como se esperaba, la información aumentaba con incrementos en la diferencia de latencia, alcanzando rápidamente un punto de saturación de 0.70 ± 0.18 bits. Con jitters fisiológicos, la diferencia de latencia que permitía a las respuestas llevar el 50 % de información máxima fue 1.9 ± 0.9 ms, y la diferencia de latencia que permitía a las respuestas llevar el 95 % de la información máxima fue 3.8 ± 1.4 ms.

La **segunda idea** intuitiva que se testó fue que los jitters de las respuestas neuronales limitan la información temporal contenida en las diferencias de latencia. Se observó que cuando se incrementaba el jitter de las respuestas neuronales, se reducía rápidamente la información extraída, desde 0.55 ± 0.18 bits con el jitter fisiológico de 1.7 ± 1.0 ms, a 0.10 ± 0.12 bits con un jitter total de 4.4 ± 0.5 ms. De igual manera, cuando se incrementaba el jitter, la diferencia de latencia que permitía a las respuestas llevar el 50 % de información máxima aumentaba desde 1.9 ± 0.9 ms a 9.1 ± 1.8 ms, y la diferencia de latencia que permitía a las respuestas llevar el 95 % de la información máxima aumentaba desde 3.8 ± 1.4 ms a 16.6 ± 3.2 ms. De forma más general, la diferencia de latencia necesaria para permitir a las neuronas

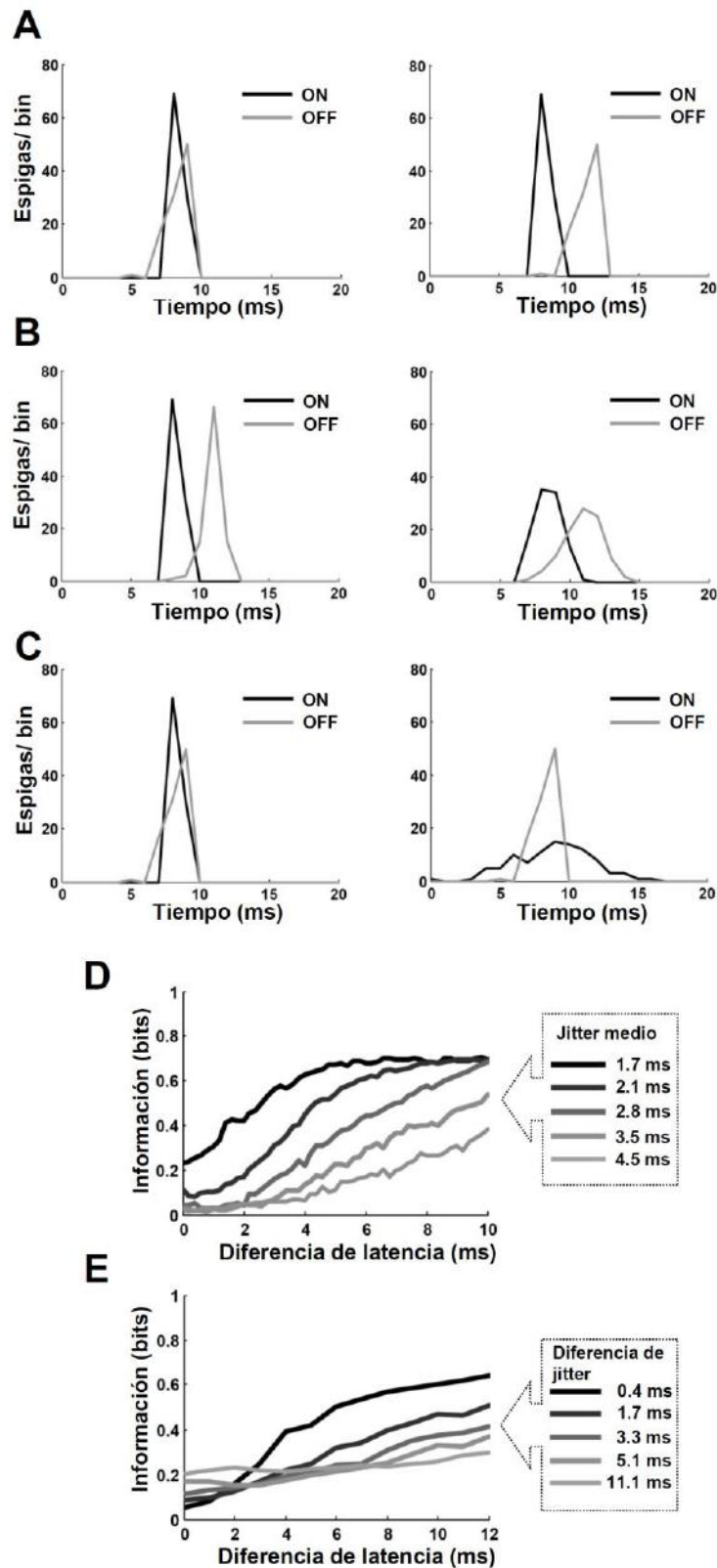


Figura 4.7. Contribución de las latencias y jitters de las primeras espigas a la información. (A) Simulaciones con diferencias de latencia. A la izquierda, los PSTHs correspondientes a las primeras espigas de una neurona representativa en la cual se impuso una diferencia de latencia de 0 ms entre las respuestas a los estímulos. A la derecha, los PSTHs correspondientes a las respuestas de la misma neurona cuando la diferencia de latencia era incrementada. (B) Simulaciones con los jitters totales. A la izquierda, los PSTHs de una neurona representativa con valores fisiológicos de latencias y jitters. (C) Simulaciones con diferencias de jitter. A la izquierda, los PSTHs correspondientes a las primeras espigas de una neurona representativa en la cual se ha impuesto una diferencia de latencia de 0 ms. A la derecha, los PSTHs correspondientes a las respuestas de la misma neurona cuando la diferencia de jitter entre las respuestas a los estímulos era incrementada. (D) La información que conlleva las respuestas incrementaba con incrementos en la diferencia de latencia y decrecía con incrementos en los jitters. (E) La información extraída de la distribución temporal de las respuestas incrementaba con incrementos en la diferencia de jitters, pero solo cuando la diferencia de latencia era próxima a cero.

transmitir una cantidad dada de información aumentaba cuando se aumentaba el jitter de las respuestas neuronales (Figura 4.7 D). Si añadir jitter a las respuestas neuronales se interpreta desde la perspectiva de una decodificación, los resultados anteriores también cuantifican cómo la imprecisión de un decodificador puede afectar a su habilidad para extraer la información que conllevan las diferencias de latencia.

Las diferencias de latencia no son la única fuente posible de información temporal. La tercera idea intuitiva que se testó fue que parte de la información no relacionada con las diferencias de latencia podía ser atribuible a diferencias de jitter entre las respuestas a los diferentes estímulos. Esta idea tenía relevancia fisiológica en nuestros datos, ya que el jitter de las respuestas al estímulo ON (1.0 ± 0.8 ms) era significativamente inferior que el jitter de las respuestas al estímulo OFF (2.4 ± 1.4 ms; *t*-test pareado: $p = 0.0004$, $n = 13$). Por cada neurona, primero se alinearon las respuestas de forma que la diferencia de latencia fuese cero y por tanto, no podía contribuir a la información. Cuando se incrementaba la diferencia de jitter, la información aumentaba alcanzando un punto de saturación mucho más bajo que el que se observó cuando se incrementaba la diferencia de latencia. Con una diferencia de jitter de 12.8 ± 4.3 ms se obtuvieron 0.26 ± 0.16 bits de información. A continuación se estudió como cambiaba la contribución a la información aportada por las diferencias de jitter en función de las diferencias de latencia. Se observó que incrementando las diferencias de jitter, la información aumentaba solo si las diferencias de latencia eran próximas a cero, mientras que siempre disminuía si las diferencias de latencia eran suficientemente altas (Figura 4.7 E).

4.1.2.5. Discriminación de estímulos vs. detección de estímulos

El problema de codificación en este trabajo fue discriminar qué estímulo ocurría (discriminación de estímulo), asumiendo que un estímulo ocurría (detección de estímulo). Aquí, nos liberamos en parte de esa asunción, extendiendo el problema de discriminación de forma que incluya al problema de detección, es decir, discriminar la presencia o ausencia de un estímulo. Así,

primero se realizó una discriminación binaria entre una ventana post-estímulo de 40ms (presencia de un estímulo) y una ventana pre-estímulo de 40ms (ausencia de estímulo), usando el número de espigas. Esos análisis se realizaron en el subgrupo de 11 neuronas que respondían a los estímulos ON y OFF aplicados en el campo receptor principal y campo receptor secundario excitador. En la discriminación entre el estímulo ON en el campo receptor principal y la ausencia de estímulo, se obtuvieron 0.65 ± 0.26 bits de información. En la discriminación entre el estímulo ON en el campo receptor secundario y la ausencia de estímulo, se obtuvieron 0.41 ± 0.32 bits de información. En la discriminación entre el estímulo OFF en el campo receptor principal y la ausencia de estímulo, se obtuvieron 0.47 ± 0.40 bits de información. En la discriminación entre el estímulo OFF en el campo receptor secundario y la ausencia de estímulo, se obtuvieron 0.48 ± 0.30 bits de información. Esos valores relativamente altos, sugieren que incluso considerando solo el número de espigas de neuronas individuales (magnitud de la respuesta), la detección de un estímulo es una tarea computacionalmente más fácil que la discriminación de un estímulo.

Se realizó también la discriminación entre los estímulos y la ausencia de estímulo, usando la magnitud y la distribución temporal de las respuestas. En la discriminación entre el estímulo ON en el campo receptor principal, el estímulo ON en el campo receptor secundario y la ausencia de estímulo, usando las magnitudes de las respuestas se obtuvieron 0.56 ± 0.26 bits de información y usando la distribución temporal se obtuvieron 0.76 ± 0.35 bits de información. En la discriminación entre el estímulo ON en el campo receptor principal, el estímulo OFF en el campo receptor principal y la ausencia de estímulo, usando las magnitudes de las respuestas se obtuvieron 0.69 ± 0.19 bits de información y usando la distribución temporal se obtuvieron 0.93 ± 0.24 bits de información. En la discriminación entre el estímulo ON en el campo receptor secundario, el estímulo OFF en el campo receptor secundario y la ausencia de estímulo, usando las magnitudes de las respuestas se obtuvieron 0.46 ± 0.29 bits de información y usando la distribución temporal se obtuvieron 0.62 ± 0.33 bits de información. Considerando la ausencia de estímulo como tercera posibilidad,

comparada a la discriminación binaria de estímulos, la información extraída de la magnitud de las respuestas y la extraída de la distribución temporal de las mismas, aumentan de forma similar, por lo que la información adicional que la distribución temporal aporta sobre la magnitud de la respuesta, permanece considerablemente constante (ver apartado 4.1.2.1). Esas observaciones soportan la aproximación metodológica adoptada en este estudio, consistente con estudios previos, en los cuales el problema computacional de discriminación de estímulos se investigó independientemente del problema de detección de estímulo.

4.2. ESTUDIO FISIOLÓGICO EN CORTEZA SOMATOSENSORIAL

4.2.1. Imagen VSD de las respuestas somatosensoriales corticales

En este trabajo se emplea la técnica de imagen VSD para registrar la activación de la corteza somatosensorial supragranular en respuesta a estímulos eléctricos a alta (6 mA) y baja intensidad (0.6 mA) aplicados separadamente en las cuatro extremidades (Figura 3.6). A continuación, proporcionaré una descripción cuantitativa de las dinámicas de activación cortical usando un ejemplo representativo (Figura 4.8).

La estimulación de la extremidad anterior contralateral (Figura 4.8 A) activó inicialmente una región que era más anterior y lateral comparada con la región activada inicialmente por estimulación de la extremidad posterior contralateral (Figura 4.8 B). La separación entre esas regiones activadas inicialmente, la cual defino aquí como "foco", fue de aproximadamente 2 mm. Esto es consistente con la organización somatotópica conocida de la corteza somatosensorial primaria de la rata. En unos pocos milisegundos, la activación se expandió y alcanzó grandes regiones más allá de los límites de la corteza somatosensorial. Esta expansión no fue uniforme, sino que ocurrió en dos direcciones principales: la más importante fue la dirección medial pero también se observó propagación en dirección posterior. La direccionalidad de propagación no uniforme (propagación anisotrópica) era más claramente

observable en respuesta a estímulos en la extremidad delantera que en la extremidad trasera.

A diferencia de la estimulación contralateral, la estimulación ipsilateral activó inicialmente dos focos que estaban bien separados y no coincidían con los focos en estimulación contralateral (Figura 4.8 C, D). Uno de los focos ipsilaterales era medial al foco contralateral y estaba localizado en corteza motora. El otro foco ipsilateral era posterior y estaba localizado en corteza somatosensorial. En pocos milisegundos, las activaciones desde esos focos se extendían uniéndose y alcanzando amplias regiones corticales, aunque la expansión total fue menor que la producida por estimulación contralateral.

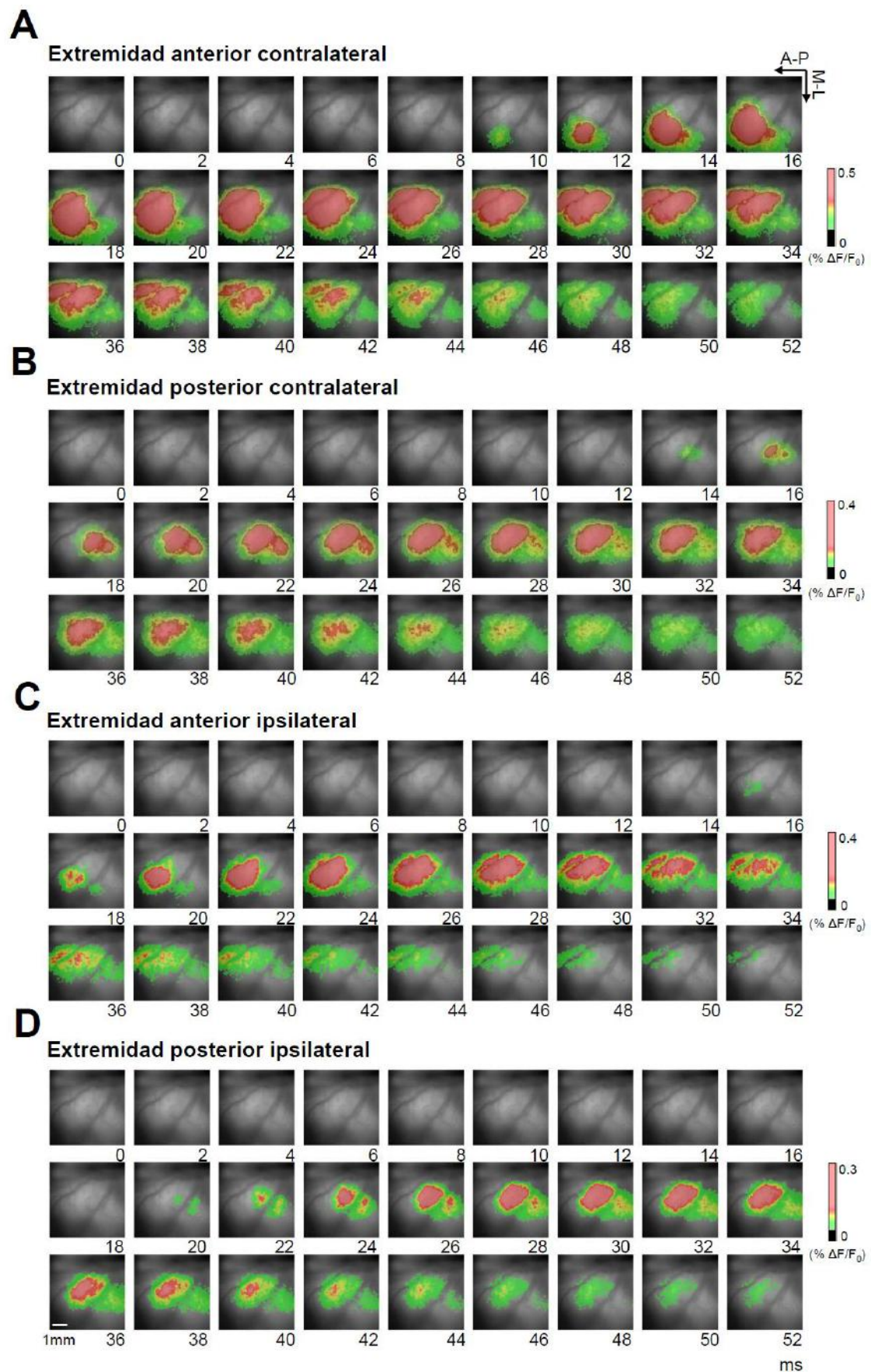


Figura 4.8. Imagen VSD de las respuestas somatosensoriales corticales. Dinámicas de activación cortical por estimulación a alta intensidad de la extremidad anterior contralateral (A), posterior contralateral (B), anterior ipsilateral (C) y posterior ipsilateral (D) en los primeros 50 ms después del estímulo (0 representa el inicio del estímulo) en un animal representativo. Las flechas indican las direcciones anterior-posterior y medial-lateral. Cada imagen corresponde promedio de 30 pruebas. La activación inicial producida por estimulación de las extremidades anterior y posterior contralaterales se corresponde con el mapa somatotópico de la corteza somatosensorial primaria de la rata, sin embargo, se ha encontrado un mapa somatotópico diferente en la activación producida por estimulación de las extremidades ipsilaterales. En pocos milisegundos la activación se expandía alcanzando grandes regiones corticales, con una direccionalidad diferente entre la corteza de la extremidad anterior y la corteza de la extremidad posterior.

En las siguientes secciones, mostraré en primer lugar los resultados cuantitativos concernientes a las medidas de las respuestas que son típicamente empleadas en estudios electrofisiológicos, tales como amplitudes y latencias de respuesta. A continuación, expondré los resultados cuantitativos relacionados con los aspectos espaciotemporales de la activación cortical, los cuales son posibles medir mediante la técnica de imagen VSD.

4.2.2. Amplitudes y latencias de las respuestas VSD en corteza somatosensorial

Se aplicaron estímulos eléctricos en las extremidades de las ratas y se midieron la amplitud, la latencia inicial y la latencia pico de las respuestas (ver apartado 3.3.6.1). La figura 4.9 A muestra un ejemplo de la activación cortical por estimulación a alta intensidad de las extremidades contralaterales e ipsilaterales (2-3 ms después de la activación inicial) y la figura 4.9 B muestra la evolución de las respuestas VSD en los puntos de máxima intensidad de los focos. La amplitud, latencia inicial y latencia pico en respuesta a estímulos de alta y baja intensidad se presentan en la Tabla 3.

La amplitud de la respuesta VSD a estímulos en la extremidad anterior contralateral fue significativamente mayor que a estímulos en la extremidad posterior contralateral (ANOVA, $p = 0.0430$, $n = 9$) (Figura 4.9 C, D) y fue significativamente mayor a alta que a baja intensidad de estimulación (ANOVA, $p = 0.0308$, $n = 9$). La latencia de la respuesta VSD fue significativamente menor para estímulos en la extremidad anterior contralateral que para estímulos en la extremidad posterior contralateral (ANOVA: latencia inicial, $p <$

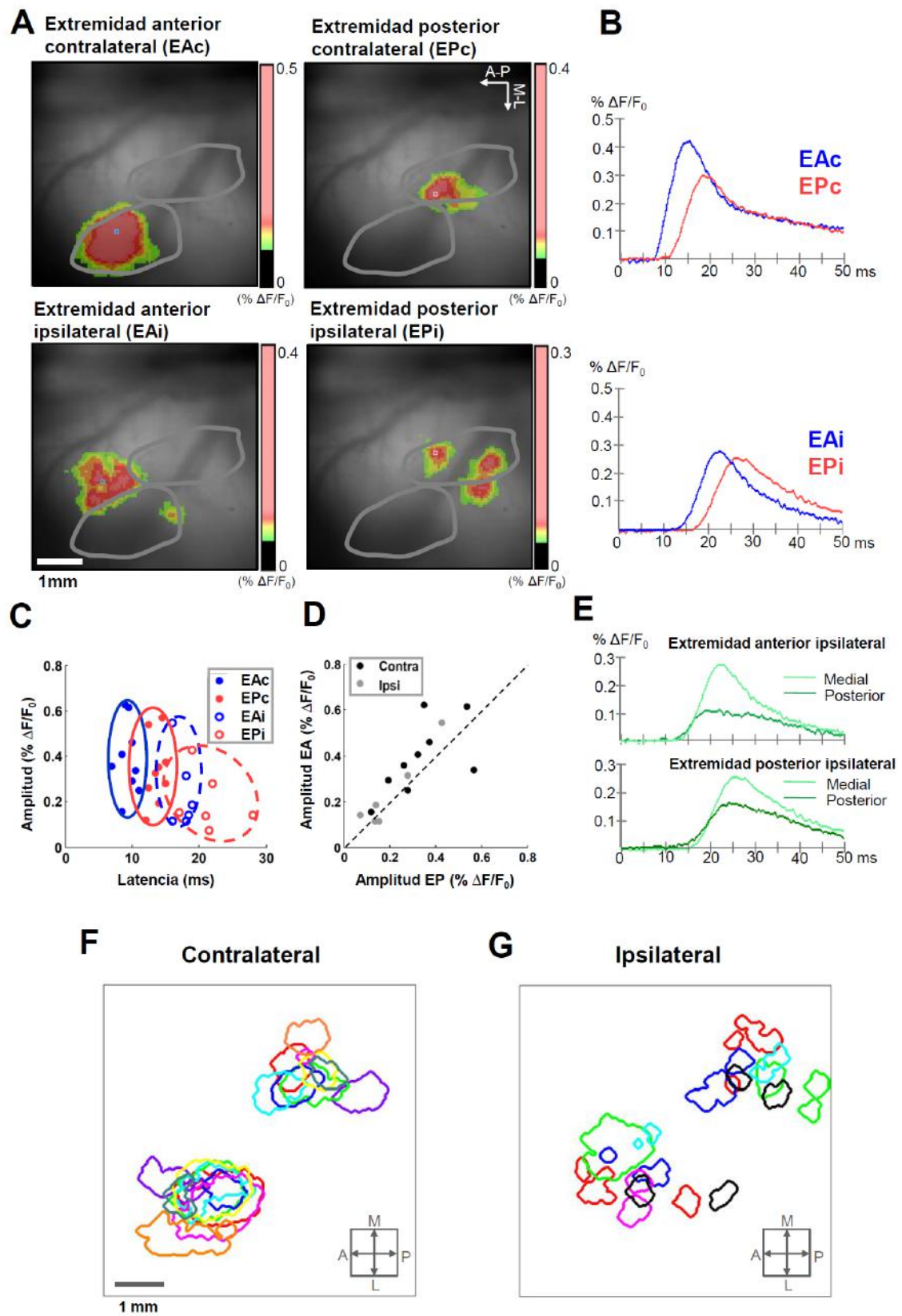


Figura 4.9. Amplitudes y latencias de las respuestas somatosensoriales corticales obtenidas con imagen VSD. (A) Activación producida por estimulación a alta intensidad de las extremidades en los primeros 2-3 ms tras el inicio de la activación en un animal representativo. Las líneas grises delimitan las regiones de la extremidad anterior y posterior en el mapa somatotópico de la corteza somatosensorial primaria de la rata. Las flechas indican las direcciones anterior-posterior y medial-lateral. Los estímulos ipsilaterales activaron dos regiones separadas, una más medial y la otra más posterior que la región activada por estímulos contralaterales. (B) Evolución temporal de las respuestas en los correspondientes puntos de máxima intensidad de activación. (C) Amplitud con respecto a la latencia de la respuesta a estimulación de las extremidades contralaterales e ipsilaterales representado para todas las ratas. (D) Amplitud de la respuesta a estimulación de las extremidades anteriores contralateral e ipsilateral con respecto a la amplitud de la respuesta a estimulación de las extremidades posteriores contralateral e ipsilateral, representado para todas las ratas. Los estímulos en la extremidad anterior producían respuestas con mayor amplitud y menor latencia que los estímulos en la extremidad posterior (para estímulos contralaterales e ipsilaterales). (E) Evolución temporal de la respuesta en el punto de máxima intensidad de activación en cada uno de los dos focos (medial y posterior al foco contralateral) producida por estimulación de las extremidades anterior y posterior ipsilateral en un animal representativo. El foco medial presentaba mayor amplitud pero mayor latencia que el foco posterior. En todos los ejes temporales, cero indica el inicio del estímulo. (F, G) Los mapas de activación inicial para estímulos de alta intensidad contralateral (F) e ipsilateral (G) para todos los animales. Las activaciones antero-laterales (parte inferior izquierda) corresponden a estimulación de la extremidad anterior, activaciones postero-medial (parte superior derecha) corresponden a estimulación de la extremidad posterior. Cada color es un animal diferente. Debido a que no había una referencia externa estereotáctica, para las ilustraciones, las activaciones iniciales (1ms) fueron alineadas de forma que para cada activación, el centro de la imagen corresponde al foco activado por estimulación a alta intensidad de la extremidad contralateral opuesta (es decir, el centro de la imagen es el foco de la extremidad posterior contralateral para las activaciones producidas por estímulos contralaterales e ipsilaterales de la extremidad anterior y es el foco de la extremidad anterior contralateral para la activación inicial por estímulos contralaterales e ipsilaterales de la extremidad posterior).

0.0001, $n = 9$; latencia en el pico, $p = 0.0004$, $n = 9$) (Figura 4.9 C) y fue significativamente más corta con estímulos de alta intensidad que con baja intensidad (ANOVA: latencia inicial, $p < 0.0001$, $n = 9$; latencia en el pico, $p = 0.0002$, $n = 9$).

Para comparar consistentemente las respuestas a estimulación ipsilateral y contralateral, se seleccionó también el foco con máximo valor de la señal en respuesta a estimulación ipsilateral, y se determinó la amplitud y latencia de la respuesta. En comparación con los estímulos contralaterales, las amplitudes de respuestas originadas por estímulos ipsilaterales fueron significativamente más pequeñas (ANOVA: factor contralateral ($n=9$)- ipsilateral ($n=6$): $p = 0.0082$) y las latencias fueron significativamente más grandes (ANOVA a dos vías, factor contralateral ($n=9$)-ipsilateral ($n=6$): $p < 0.0001$ para latencia inicial y latencia pico).

Tabla 3. Amplitudes y latencias de las respuestas VSD corticales a estimulación eléctrica de las extremidades

| | Amplitud (% DF/F) | Latencia (ms) | Latencia pico (ms) |
|---------------------------------|-------------------|------------------|--------------------|
| Alta intensidad (6 mA) | | | |
| EAc | 0.39 ± 0.16 | 9.40 ± 0.65 | 16.67 ± 2.98 |
| EPc | 0.33 ± 0.15 | 13.50 ± 1.22 | 20.06 ± 1.88 |
| EAI | 0.24 ± 0.17 | 17.50 ± 1.28 | 24.50 ± 2.30 |
| EPI | 0.20 ± 0.13 | 21.42 ± 3.72 | 30.67 ± 4.40 |
| Baja intensidad (0.6 mA) | | | |
| EAc | 0.28 ± 0.15 | 16.20 ± 7.21 | 27.56 ± 7.83 |
| EPc | 0.19 ± 0.11 | 23.20 ± 5.13 | 33.61 ± 11.33 |
| EAI | - | - | - |
| EPI | - | - | - |

(EAc = Extremidad anterior contralateral, EPc = Extremidad posterior contralateral; EAI = Extremidad anterior ipsilateral; EPI = Extremidad posterior ipsilateral)

Para investigar posibles diferencias entre las respuestas en los dos focos producidos por estimulación ipsilateral, se seleccionó el punto con valor de señal máximo en cada uno de los dos focos (medial y posterior), y se estudiaron la amplitud y latencia de respuesta en esos puntos. Se encontró que la amplitud de respuesta era ligeramente superior en el foco medial (motor) que en el posterior (somatosensorial) (ANOVA: factor foco medial- foco posterior, $p = 0.0334$, $n = 6$; factor extremidad delantera-extremidad trasera, $p = 1.00$, $n = 9$; interacción $p = 0.077$), sin embargo, se encontró que la latencia de la respuesta a mitad del pico en el foco posterior (somatosensorial) era más pequeña que en el foco medial (motor) (ANOVA a dos vías, factor foco medial- foco posterior, $p = 0.00040$, $n = 6$; factor extremidad delantera-extremidad trasera, $p = 0.0118$, $n = 9$; interacción $p = 0.63$) (Figura 4.9 E). Las amplitudes y latencias de las respuestas a estímulos ipsilaterales, separadamente para cada uno de los dos focos, se presentan en la Tabla 4. Los mapas de activación inicial contralateral e ipsilateral desde todos los animales se muestran en las figuras 4.9 F y G.

Tabla 4. Amplitudes y latencias en los dos focos de las respuestas ipsilaterales

| | Amplitud (% DF/F) | Latencia a mitad del pico (ms) |
|---|-------------------|--------------------------------|
| Extremidad anterior ipsilateral | | |
| Foco medial (motor) | 0.22 ± 0.16 | 19.83 ± 1.81 |
| Foco posterior (somatosensorial) | 0.16 ± 0.14 | 18.75 ± 1.84 |
| Extremidad posterior ipsilateral | | |
| Foco medial (motor) | 0.20 ± 0.13 | 23.75 ± 2.91 |
| Foco posterior (somatosensorial) | 0.19 ± 0.14 | 22.00 ± 2.05 |

4.2.3. Extensión de las respuestas VSD en corteza somatosensorial

Los estímulos somatosensoriales producen inicialmente una activación localizada, la cual, se expande después a regiones corticales mayores más allá de la corteza somatosensorial.

En primer lugar, se calculó el área de la región cortical activada por estimulación de las extremidades anterior y posterior contralateral durante los primeros 100 milisegundos de la respuesta (Figura 4.10 A, B). El área máxima activada debida a estimulación de la extremidad anterior fue mayor que la debida a estimulación de la extremidad posterior (ANOVA, $p = 0.0084$, $n = 9$). La máxima área activada aplicando estímulo de alta intensidad fue mayor que aplicando estímulo de baja intensidad (ANOVA a dos vías, factor alta intensidad-baja intensidad: $p = 0.0006$, $n = 9$). Los valores correspondientes de las áreas máximas activadas y las latencias a las cuales se alcanzaba el área máxima se presenta en la Tabla 5. Se observaron diferencias similares para las áreas máximas activadas debido a estímulos ipsilaterales, las cuales eran en general, más pequeñas comparadas con los estímulos contralaterales (Figura 4.10 A, B).

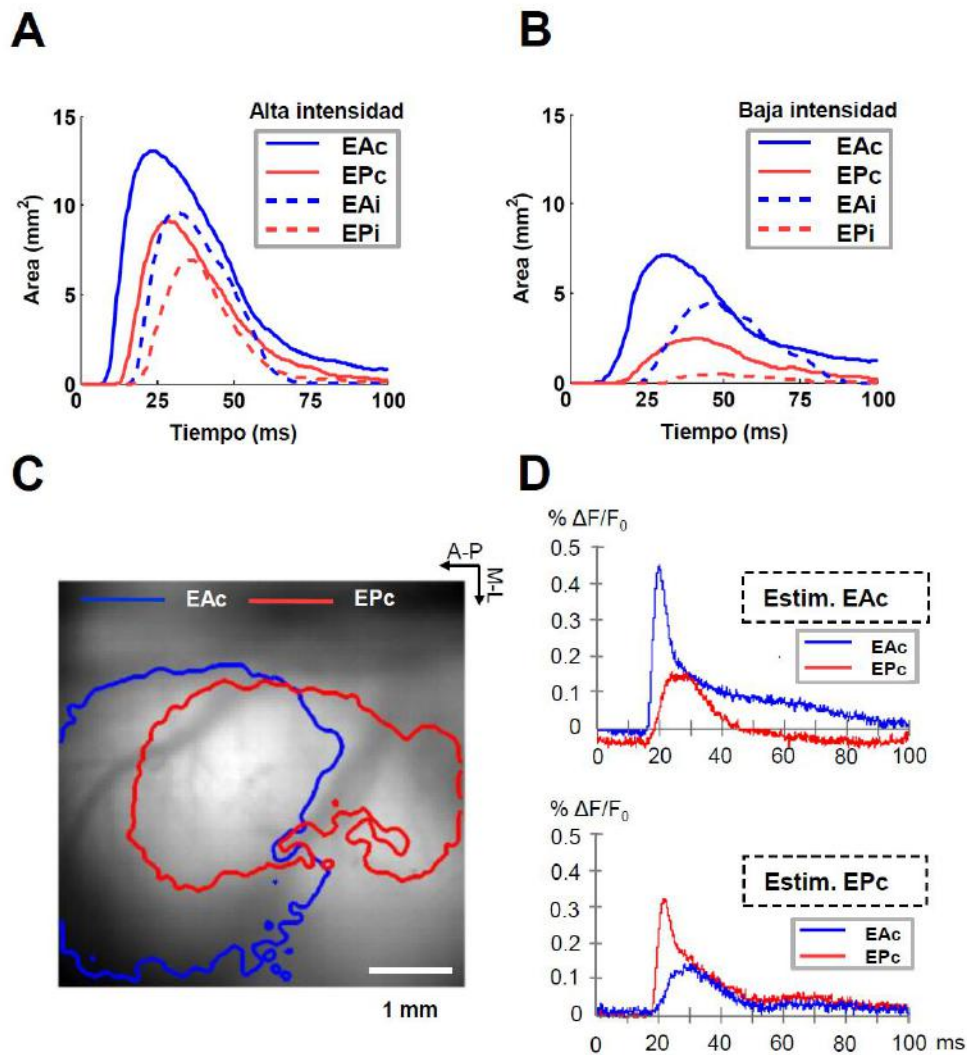


Figura 4.10. Extensión de las respuestas VSD en corteza somatosensorial. (A, B) Evolución temporal del área activada en los primeros 100 ms de las respuestas a estimulación de las extremidades anterior y posterior contralaterales (EAc, EPc) e ipsilaterales (EAI, EPI) a alta intensidad (A) y baja intensidad (B). Las curvas son el promedio de todos los animales. La extensión de la activación era mayor y más rápida con estimulación de la extremidad anterior comparada con la extremidad posterior y con estimulación contralateral comparado con ipsilateral. (C) Solapamiento cortical entre las máximas regiones activadas por estimulación de las extremidades anterior y posterior en un animal representativo. Las flechas indican las direcciones anterior-posterior y medial-lateral. (D) Evolución temporal de las respuestas en el foco de la EA y en el foco de la EP por estimulación de la EAc (arriba) y de EPc (abajo) en un animal representativo. La estimulación de una extremidad produce respuestas no solo en su correspondiente región cortical sino también en la región cortical correspondiente a la otra extremidad.

La mayor pendiente en la curva correspondiente a la evolución temporal del área activada en respuesta a estímulos en la extremidad anterior sugería una más rápida activación comparada con estímulos en la extremidad posterior

(Figura 4.10 A, B). Para cuantificar la velocidad de activación, se calculó la derivada del área con respecto al tiempo. La velocidad de activación máxima para estimulación de la extremidad anterior contralateral fue significativamente superior que para estimulación de la extremidad posterior (ANOVA, $p = 0.0017$, $n = 9$) y fue significativamente mayor usando alta intensidad que baja intensidad (ANOVA, $p < 0.0001$, $n = 9$). Los valores de la máxima velocidad de activación se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Medidas espaciotemporales de la extensión de las respuestas VSD en corteza somatosensorial a estimulación contralateral

| | | ALTA INTENSIDAD | BAJA INTENSIDAD |
|---|-------|-----------------|-----------------|
| A_{MAX} (mm²) | EA | 14.38 ± 4.91 | 9.04 ± 6.83 |
| | EP | 9.67 ± 4.64 | 3.02 ± 3.23 |
| Latencia_{MAX} (mm²) | EA | 23.89 ± 5.44 | 39.94 ± 9.25 |
| | EP | 27.67 ± 4.60 | 41.00 ± 7.71 |
| Velocidad Activación_{MAX} (mm²/ms) | EA | 2.44 ± 0.66 | 1.16 ± 1.00 |
| | EP | 1.30 ± 0.49 | 0.34 ± 0.29 |
| Máximo solapamiento cortical (mm²/ms) | EA-EP | 7.51 ± 4.44 | 0.52 ± 0.57 |

(EA = Extremidad anterior; EP = Extremidad posterior)

Con estímulos de alta intensidad, la activación cortical producida por estimulación de la extremidad anterior contralateral alcanzaba el foco de la extremidad posterior en el 100 % de los animales, y la activación cortical producida por estimulación de la extremidad posterior contralateral alcanzaba el foco de la extremidad anterior en el 44 % de los animales (Figura 4.10 D). Un estímulo en la extremidad anterior producía una respuesta VSD en el foco de la extremidad posterior con una amplitud que era un 61 % más pequeña (t -test: $p < 0.0001$, $n = 9$) y 8.61 ± 2.88 ms más lenta (t -test: $p < 0.0001$, $n = 9$) que en el foco de la extremidad anterior, y un estímulo en la extremidad posterior producía una respuesta VSD en el foco de la extremidad anterior con una amplitud que era un 67 % más pequeña (t -test: $p = 0.0042$, $n = 4$) y $11.13 \pm$

4.80 ms más lenta (t -test: $p = 0.0037$, $n = 4$) que en el foco de la extremidad posterior. Teniendo en cuenta la distancia entre el foco de la extremidad anterior y el foco de la extremidad posterior (2.15 ± 0.50 mm), se determinó que la velocidad de activación linear desde el foco de la extremidad anterior al foco de la extremidad posterior (0.12 ± 0.04 mm/ms, $n = 9$) era más grande que la velocidad linear de activación desde el foco de la extremidad posterior hasta el foco de la extremidad anterior (0.08 ± 0.01 mm/ms, $n = 4$) (t -test: $p = 0.0112$).

4.2.4. Direccionalidad de las respuestas VSD en corteza somatosensorial

Los estímulos somatosensoriales producían activaciones corticales que se expandían no uniformemente a través de la corteza. Aquí, se estudió la posible direccionalidad de las dinámicas de activación, enfocando el estudio en la respuesta a estimulación contralateral. Primero se construyeron mapas de contorno de la evolución temporal de la región activada (ver apartado 3.3.6.3; Figura 4.11 B). Se pudo observar claramente que una diferente direccionalidad en las dinámicas de activación entre estimulación de las extremidades anterior y posterior.

Para estudiar cuantitativamente esta direccionalidad, se calculó el centro de activación global en cada instante y se siguió su evolución espaciotemporal hasta que el área activada alcanzaba el máximo valor (ver apartado 3.3.6.3; Figura 4.11 B; Tabla 6). Las dinámicas de activación por estimulación de la extremidad anterior implicaban un movimiento significativo del centro de activación global en la dirección medial (t -test: medial-lateral, $p = 0.0001$, $n = 9$), y una tendencia de movimiento más pequeño en dirección posterior (t -test: anterior-posterior, $p = 0.06$, $n = 9$). Por el contrario, no había movimiento significativo del centro de activación global por estimulación de la extremidad trasera en ninguna dirección (t -test: medial-lateral, $p = 0.12$; anterior-posterior, $p = 0.38$, $n = 9$). Debido a que la expansión no era uniforme, el centro de activación global no proporcionaba necesariamente una descripción completa de la dirección de activación. Para ello, se siguió la evolución espaciotemporal del centro de activación en cada uno de los cuatro cuadrantes definidos por los

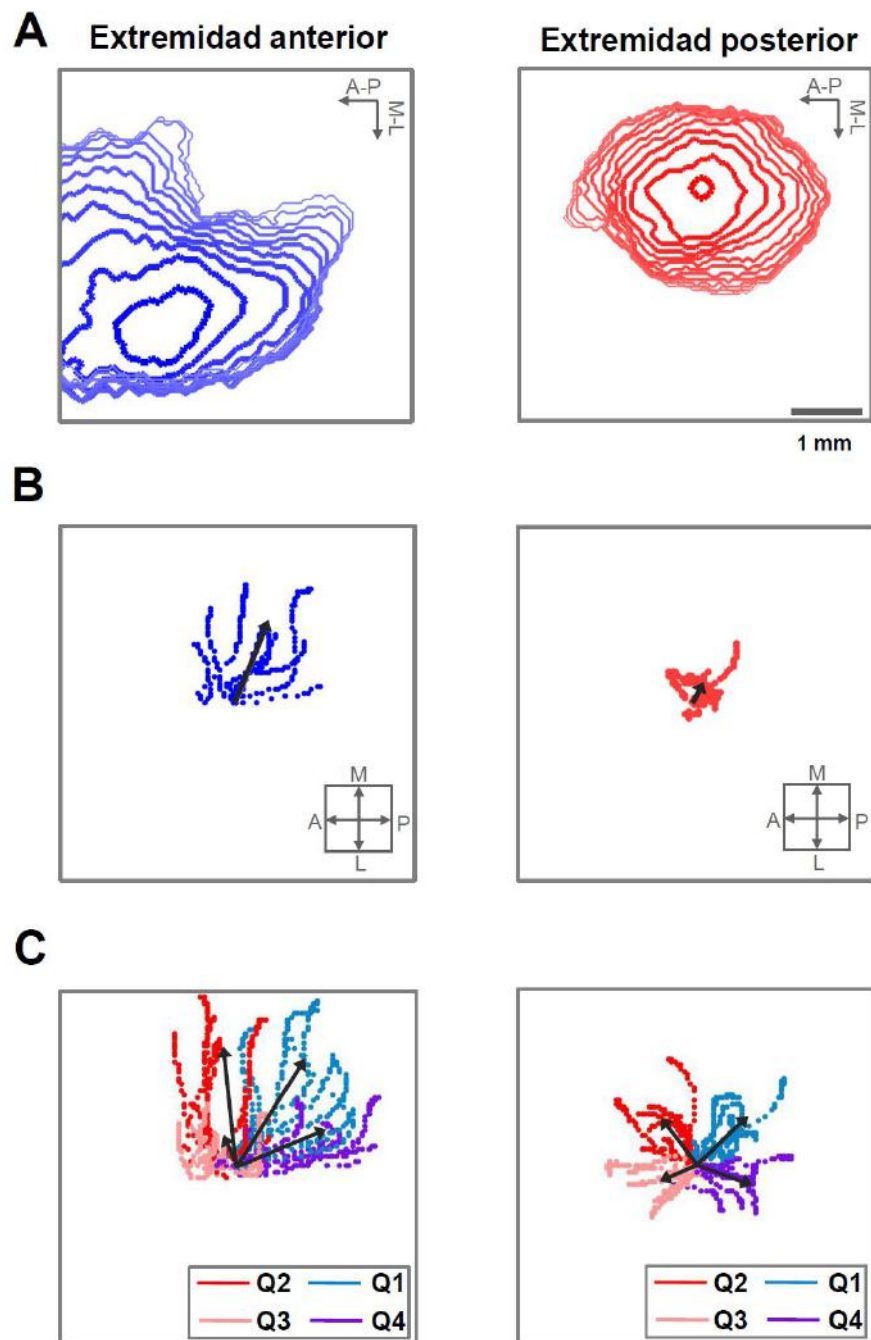


Figura 4.11. Direccionalidad de las respuestas VSD en corteza somatosensorial a estímulos contralaterales. (A) Mapas de contorno de la evolución temporal de la región activada por estimulación de la extremidad delantera (izquierda) y trasera (derecha) contralateral en un animal representativo. Los contornos se muestran cada 1 ms desde la activación inicial hasta que el área activada alcanzaba el máximo valor. Las flechas indican las direcciones anterior-posterior y medial-lateral. (B) Evolución espaciotemporal del centro de activación global para estímulos en la extremidad delantera (izquierda) y trasera (derecha) hasta que el área activada era máxima, en todos los animales. (C) Evolución espaciotemporal del centro de activación en los cuatro cuadrantes (Q1-Q4) para estímulos en la extremidad delantera (izquierda) y trasera (derecha) hasta que el área activada era máxima, en todas las ratas. En B,C los centros de activación inicial corresponden a cada rata donde eran alineadas y situadas en el centro de la imagen y las flechas en un pequeño cuadro indican las direcciones anterior-posterior y medial-lateral.

ejes anterior-posterior y medial-lateral alrededor del centro de activación global (ver apartado 3.3.6.3; Figura 4.11 C; Tabla 6).

Tabla 6. Direccionalidad de las respuestas VSD en corteza somatosensorial a estímulos contralaterales

| | MEDIAL-LATERAL | | ANTERIOR-POSTERIOR | |
|---|----------------|-------------|--------------------|-------------|
| | EA | EP | EA | EP |
| Centro de activación global (mm) | 1.49 ± 0.89 | 1.07 ± 1.11 | 1.60 ± 0.51 | 1.27 ± 0.59 |
| Centro de activación, Q1 (mm) | 0.32 - 4.79 | 0.00-3.37 | 0.90 - 2.64 | 0.64 - 2.65 |
| Centro de activación, Q2 (mm) | 2.2 ± 3.4 | 4.7 ± 4.9 | 1.0 ± 1.6 | 1.2 ± 1.3 |
| Centro de activación, Q3 (mm) | 67 ± 21 | 50 ± 28 | 65 ± 21 | 70 ± 21 |
| Centro de activación, Q4 (mm) | 10.3 ± 3.5 | 14.6 ± 6.0 | 9.2 ± 2.6 | 13.3 ± 4.7 |

(Los valores representan el movimiento máximo del centro de activación global y el centro de activación en los cuatro cuadrantes con respecto al centro de activación global inicial. Q1-Q4 corresponden a los 4 cuadrantes y valores positivos indican movimiento medial o anterior y valores negativos indican movimiento lateral o posterior)

Consistentemente con los resultados obtenidos en el párrafo anterior, la expansión de la activación debido a estimulación de la extremidad anterior tenía una evolución neta en dirección medial, mientras la expansión de la activación debido a estimulación de la extremidad posterior era más homogénea en todas las direcciones. Existiendo una diferente direccionalidad en las dinámicas de activación entre estimulación de la extremidad anterior y posterior. Se observaron diferencias similares en las dinámicas de activación por estimulación de las extremidades anterior y posterior, al analizar las respuestas a estimulación de las extremidades ipsilaterales (Figura 4.12).

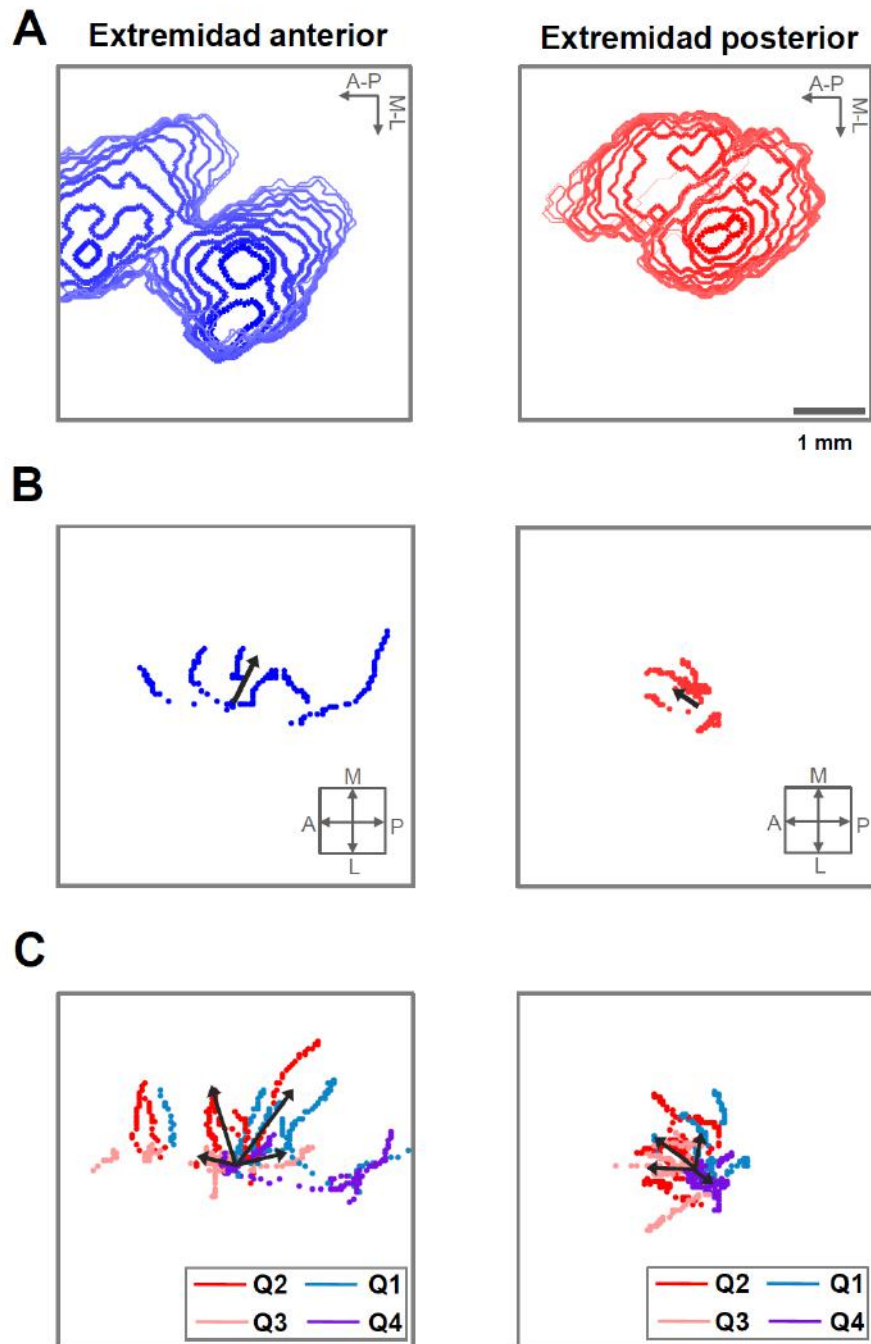


Figura 4.12. Direccionalidad de las respuestas VSD en corteza somatosensorial a estímulos ipsilaterales. (A) Mapas de contorno de la evolución temporal de la región activada por estimulación de la extremidad anterior (izquierda) y posterior (derecha) ipsilateral en un animal representativo. (B) Evolución espaciotemporal del centro de activación global para estímulos en la extremidad anterior (izquierda) y posterior (derecha) hasta que el área activada era máxima, en todos los animales. (C) Evolución espaciotemporal del centro de activación en los cuatro cuadrantes (Q1-Q4) para estímulos en la extremidad anterior (izquierda) y posterior (derecha) hasta que el área activada era máxima, en todas las ratas.

5. DISCUSIÓN

La presente tesis constituye un profundo análisis de la fisiología del sistema somatosensorial de la rata en dos niveles críticos para el procesamiento somatosensorial, como son tálamo y corteza. En tálamo, realizamos un estudio fino, a nivel de neuronas individuales, de la fisiología en la región correspondiente a las vibrisas (núcleo VPM) y en la región correspondiente a las extremidades (núcleo VPL). Sobre los resultados del estudio fisiológico en tálamo se ha realizado un complejo análisis de información que permite comparar los aspectos temporales del código neural con la cuantificación de la magnitud de respuesta neuronal a los estímulos periféricos. Dicho estudio está basado en los datos experimentales, así como, en experimentos computacionales. Finalmente, el estudio de la fisiología somatosensorial en la región de las extremidades es extendido desde el tálamo a la corteza cerebral. Para ello, empleamos la técnica de imagen VSD, la cual, nos ha permitido investigar con una amplia perspectiva espaciotemporal, las claves de la activación sensoriomotora supragranular en respuesta a estimulación de las extremidades. De esta manera, estructuramos la presente discusión en torno a los tres estudios anteriores, en correspondencia con los objetivos planteados en este trabajo.

5.1. FISIOLOGÍA DE LAS NEURONAS DE LOS NÚCLEOS TALÁMICOS VPM Y VPL

El sistema trigeminal de la rata se ha empleado de forma generalizada para el estudio del procesamiento somatosensorial, sin embargo, es importante conocer si las características de ese procesamiento son comunes fuera de dicho sistema, es decir, en las regiones que corresponden a las extremidades. Para intentar esclarecer esta cuestión, en este trabajo se ha estudiado las respuestas de las neuronas de los núcleos VPM y VPL a estímulos ON, OFF e impulso. Lo que denominamos estímulos ON y OFF se corresponden respectivamente con el inicio y final de un pulso cuadrado de 500 ms de duración, en el cual estudiamos la activación neuronal alrededor de dichos instantes temporales. Asimismo, denominamos impulso a un pulso cuadrado de corta duración (1 ms). Un estímulo impulsivo es pues un estímulo ON-OFF de

muy corta duración. Nosotros observamos esencialmente idéntica estructura de magnitud/latencia de respuesta en las neuronas correspondientes a las extremidades delantera, trasera y vibrisas (véanse Tabla 1 y Figura 4.2). Con la única excepción de un gradiente en la latencia de respuesta entre las neuronas de vibrisas y de extremidad anterior y entre la extremidad anterior y la extremidad posterior. Estas diferencias son debidas a las diferencias en la distancia recorren las aferencias primarias desde las extremidades posteriores, anteriores y vibrisas hacia el tronco del encéfalo. Por tanto, se genera una diferencia en los tiempos de activación neuronal en el tronco del encéfalo dependiendo de los diferentes lugares de estimulación.

Nuestros resultados muestran también que tanto en el núcleo VPL como en el núcleo VPM, existen neuronas cuyas respuestas presentan preferencia ante determinados estímulos. Más concretamente, encontramos neuronas con preferencia ante el estímulo ON, esto es, que responden con mayor eficiencia al estímulo ON; encontramos también neuronas con preferencia ante el estímulo OFF y neuronas con igual preferencia a los dos estímulos, existiendo pues un gradiente de respuestas en una población talámica ante un mismo estímulo, que va desde la respuesta pura al estímulo ON, hasta la respuesta pura al estímulo OFF (véase Figura 4.3). De este modo, un mismo estímulo producirá respuestas diferentes o heterogéneas en una población neuronal talámica, que forma el agregado neuronal que se corresponden somatotópicamente la región corporal estimulada, pudiendo verse este procesamiento neuronal como una descomposición de las características del estímulo en respuestas neuronales heterogéneas. Estos resultados concuerdan con la más conocida fisiología del núcleo VPM, donde se ha visto que la información somatosensorial es procesada de manera distribuida por grupos de poblaciones de neuronas funcionalmente heterogéneas dentro de cada agregado/barriloide (Nicollelis & Chapin, 1994). Nuestros resultados indican pues, que dicho funcionamiento no es exclusivo de las neuronas correspondientes a las vibrisas (núcleo VPM), sino que se extiende también a las neuronas correspondientes a las extremidades (núcleo VPL). Es bien conocido que las neuronas de un barriloide talámico se corresponden

anatómicamente con una vibrisa, es decir, responden de forma más eficiente a los estímulos recibidos por su correspondiente vibrisa (Welker, 1971; Brecht et al., 2003), sin embargo, esa eficiencia en la respuesta neuronal varía en función de la dirección en la que se estimule la vibrisa, de forma que existe una preferencia angular en subgrupos de neuronas dentro del barriloide (Timofeeva et al., 2003). Así que la estimulación de una vibrisa en diferentes ángulos se corresponde con la activación de neuronas en distintas localizaciones espaciales dentro de un barriloide de VPM (Timofeeva et al., 2003). Por tanto, encontramos que la complejidad en la posibilidad de estimular el campo receptor principal para las neuronas del VPM es equivalente a la de las neuronas del VPL. En conclusión, dentro de una agrupación/agregado talámica que define un campo receptor hay subgrupos de neuronas con diferentes localizaciones espaciales que responderían o se activarían de forma diferente según los distintos tipos de estímulos que se pueden recibir en una región concreta de la superficie corporal, siendo en ambos casos un problema continuo de determinación de campo receptor.

Como hemos mencionado anteriormente, la especialización neuronal como modo de procesamiento somatosensorial es una característica común a todo el complejo ventrobasal. La alta especialización neuronal exige grandes regiones somatosensoriales dedicadas al procesamiento somatosensorial. En clara concordancia con esto está el hecho de que encontremos una representación topográfica de las garras mucho mayor que la del resto de la extremidad (Francis et al., 2008) puesto que son zonas corporales altamente implicadas en la recepción de estímulos y exigen por tanto, una elevada cantidad de recursos neuronales. Asimismo, las neuronas de estas regiones poseen campos receptores de menor tamaño que las del resto de la extremidad (Angel & Clarke, 1975). Curiosamente, en este trabajo hemos visto que tanto en el VPM como en el VPL, el tamaño del campo receptor era diferente para el estímulo ON y el estímulo OFF, o lo que es lo mismo, la respuesta al estímulo OFF no decrece, como lo hace la respuesta al estímulo ON, cuando el estímulo es movido del centro del campo receptor (campo receptor principal, por ejemplo, un dígito o una vibrisa) hasta un campo

receptor secundario (por ejemplo, un dígito vecino o vibrisa vecina). Lo cual sugiere que el campo receptor para el estímulo OFF tiene una forma espacial diferente que para el estímulo ON (véase Figura 4.4). Desde una perspectiva funcional, la alta precisión espacial de las respuestas al ON pueden ser críticas para determinar exactamente dónde empieza un estímulo, mientras la baja precisión espacial de las respuestas al OFF puede proporcionar una señal distribuida de cuándo un estímulo termina.

Así pues, este trabajo pone de manifiesto la homogeneidad fisiológica del complejo ventrobasal, mediante un análisis de las respuestas de neuronas talamocorticales correspondientes a las vibrisas y a las extremidades delantera y trasera. Y corrobora la importancia de la heterogeneidad en las respuestas neuronales que forman la población o agregado que se activa ante cada estímulo.

5.2. CÓDIGO NEURAL EN LOS NÚCLEOS TALÁMICOS VPM Y VPL

En el presente trabajo se analiza la importancia de la información temporal frente a la información extraída por la magnitud de las respuestas en todo el complejo ventrobasal. Pero para entender los resultados, conviene hacer unas aclaraciones previas. En este trabajo se ha considerado que la información extraída de la distribución temporal ("spike-timing") incluye información temporal e información extraída de la magnitud de respuesta. En general, estas dos informaciones no son independientes, sino que pueden relacionarse entre sí con una cierta sinergia/redundancia (ver apartado 3.2.5.2.3). Trabajos previos han mostrado que en el núcleo VPM la información extraída de la distribución temporal de las respuestas, es decir, "spike-timing", conlleva más información que la magnitud de respuesta (expresada como número de espigas/estímulo) tanto en la discriminación de la localización del estímulo (Gazanfar et al., 2000) como en la discriminación de la dinámica del estímulo (Montemurro et al., 2007). En el presente trabajo se extienden estos resultados desde la región talámica correspondiente a las vibrisas (núcleo VPM) hasta la región talámica correspondiente a las extremidades (núcleo

VPL), llevando al nivel de información la homogeneidad que previamente investigamos a nivel fisiológico (Aguilar et al., 2008).

Como modelo de discriminación de la localización del estímulo se han usado las respuestas al estímulo ON para discriminar entre los estímulos que fueron aplicados en el campo receptor principal y los estímulos aplicados en el campo receptor secundario excitador (véase Figura 4.5 A). Asimismo, se ha analizado la discriminación de la dinámica temporal del estímulo, para lo cual se han comparado los estímulos ON y OFF aplicados en el campo receptor principal (véase Figura 4.5 B, C). Recordamos que denominamos estímulo ON al inicio de un estímulo de larga duración y estímulo OFF al final de dicho estímulo. En ambos modelos de discriminación, considerar la distribución temporal de las respuestas proporcionó más información que considerar únicamente la magnitud de las mismas en las neuronas del VPL.

En el sistema somatosensorial se ha demostrado que las primeras espigas de las respuestas neuronales en cada prueba del estímulo conllevan la mayor parte de la información sobre la discriminación del estímulo (Panzeri et al., 2001; Petersen et al., 2001; Foffani et al., 2004). En este trabajo, nuestros datos muestran que la primera espiga de cada respuesta conlleva la mayor parte de la información temporal en el complejo ventrobasal (núcleos VPM y VPL). Estos resultados son coherentes con el tipo de actividad de las neuronas talamocorticales, las cuales presentan una baja actividad (espigas) en respuesta a estímulos, que puede oscilar entre 0.5 y 2 espigas por estímulo (Hartings et al., 2000; Montemurro et al., 2007; Kyriazi et al., 1994; Armstrong-James & Callahan, 1991). Este bajo número de espigas en las respuestas a los estímulos de las neuronas de los núcleos VPM y VPL sugiere la existencia de otros elementos de la respuesta más significativos en la transmisión de información acerca de las características de los estímulos. Esos elementos de las respuestas pueden ser los aspectos temporales, más concretamente la latencia de las mismas. Nuestros experimentos computacionales confirman que la información temporal es aportada principalmente por las diferencias de latencia entre las respuestas a diferentes estímulos. Para que las diferencias de latencia entre las respuestas a los estímulos sea la contribución más

importante a la información temporal es necesario que las respuestas individuales a los estímulos sean muy precisas y esta es, efectivamente, una característica de las neuronas talamocorticales (Nicolelis & Chapin, 1994; Aguilar & Castro-Alamancos, 2005; Petersen et al., 2008). De esta manera, las diferencias de latencias entre estímulos pueden ser un elemento clave para la transmisión de la información dentro de una población de neuronas altamente sincronizadas.

De esto se deduce que la variabilidad temporal de las respuestas de una neurona ante un mismo estímulo ("jitter") sería perjudicial para la transmisión de información. En este trabajo, se han realizado experimentos computacionales en los que se han introducido de forma artificial jitters en las respuestas neuronales ante estímulos reales. El resultado ha sido que la presencia de jitters va en detrimento de la información contenida en las diferencias de latencias, que es lo que permitiría discriminar entre estímulos. Sin embargo, la presencia de jitter cuando las latencias de respuestas a diferentes estímulos son suficientemente pequeñas (cercanas a cero), pueden aumentar la información sobre los estímulos y mejorar la discriminación (véase Figura 4.7 E). Ambos experimentos computacionales demuestran que la precisión temporal es fundamental para una precisa extracción de información de las respuestas neuronales, y que tanto la precisión temporal como la variabilidad temporal que muestran las diferentes respuestas pueden aportar información dependiendo del tipo de estímulos que el sistema tiene que comparar.

Además del problema de discriminación entre estímulos, en este trabajo se ha investigado el problema de la detección de estímulo en las neuronas del VPL que respondían a los estímulos ON y OFF aplicados en el campo receptor principal y campo receptor secundario excitador (ver apartado 4.1.2.5). Para ello se realizó una discriminación entre los estímulos (ventana post-estímulos) y la ausencia de estímulo (ventana pre-estímulo) usando el número de espigas y la distribución temporal de las mismas. Los resultados en el problema de detección de estímulo fueron en la misma línea que en el problema de discriminación de estímulos, es decir, la información aportada por la

distribución temporal fue mayor que la información aportada por el número de espigas o magnitud de respuesta en las neuronas del VPL. Los valores de información obtenidos en la detección de estímulos son superiores a los obtenidos en la discriminación entre estímulos, lo cual sugiere que la discriminación entre estímulos es una tarea computacionalmente más complicada que la detección de estímulos en el animal anestesiado. Lo que está en concordancia con las observaciones de Sherman (2001) en las que cuando las neuronas se encuentran en el modo ráfaga (animal en reposo, somnoliento o anestesiado) la respuesta al estímulo permite una mejor detección de la señal (aunque menor fiabilidad para responder a estímulos de alta frecuencia). De hecho, el modo ráfagas puede ser un modo efectivo de transmisión de información incluso en el animal despierto (Ortuño et al., 2014).

En conclusión, nuestros análisis de información realizados sobre las respuestas neuronales ante estímulos reales y los experimentos computacionales usados para modificar latencias y variabilidad temporal de las mismas, confirman que en la discriminación y detección de estímulos, la información temporal puede ser más alta que la información contenida en la magnitud de respuesta en todo el complejo ventrobasal.

5.3. IMAGEN VSD DE LA REGIÓN CORRESPONDIENTE A LAS EXTREMIDADES EN CORTEZA SENSORIOMOTORA

El objetivo de esta parte del trabajo ha sido estudiar la fisiología de la corteza somatosensorial, concretamente de la región perteneciente a las extremidades, con el fin de aportar un mayor conocimiento sobre cómo son las dinámicas de activación espaciotemporal de las capas corticales supragranulares en respuesta a estimulación de las extremidades. Para ello, se empleó la técnica de imagen VSD para visualizar en un hemisferio la activación en respuesta a estimulación de las cuatro extremidades. Los estímulos consistieron en pulsos eléctricos cuadrados aplicados separadamente en cada una de las extremidades. Se utilizaron dos niveles de intensidad, una baja intensidad de 0.6 mA que activa solo una fracción de las fibras disponibles, que

corresponden en su mayoría a las fibras táctiles ($A\beta$) y propioceptivas ($A\alpha$) que se activan a bajo umbral, y una alta intensidad (6 mA) con el objetivo de activar todas las fibras disponibles, en cuyo caso se reclutan también las fibras de alto umbral como son las termorreceptivas y nociceptivas ($A\delta$ y C) (Lilja et al., 2006). De esta forma, se consigue un buen control de las respuestas fisiológicas debido a distinto grado de reclutamiento de fibras periféricas dependiendo del tipo de estimulación.

Nuestros resultados muestran que la activación de la región cortical correspondiente a la extremidad delantera por estimulación de la extremidad delantera presentan una mayor amplitud y menor latencia que la activación de la región cortical correspondiente a la extremidad trasera por estimulación de la extremidad trasera (véanse Figura 4.9 y Tabla 3). Lo cual indica que los resultados obtenidos con la técnica de imagen VSD sobre la activación de capas supragranulares son consistentes con los resultados obtenidos en capas infragranulares con técnicas más clásicas como la electrofisiología (Moxon et al., 2008; Aguilar et al., 2010). A nivel espacial, la localización de la activación inicial en respuesta a estimulación contralateral concuerda con el mapa somatotópico cortical conocido para extremidad delantera y trasera (Chapin & Lin, 1984). La estimulación de las extremidades ipsilaterales a la corteza visualizada, produce en la misma una activación inicial que se encuentra dividida en dos focos, los cuales no coinciden en coordenadas somatotópicas con el foco de activación por estimulación de las extremidades contralaterales (2012, véase Figura 4.9 A). Esto es consistente con el bajo solapamiento de las respuestas que se ha descrito en capas infragranulares a estimulación táctil de las extremidades delanteras contralateral e ipsilateral (Tutunculer et al., 2006).

La gran ventaja de la técnica de imagen VSD es la alta resolución temporal y espacial que aporta al estudio de la fisiología cortical. Esto es idóneo para un estudio preciso de las dinámicas de activación y de los aspectos espaciales de las respuestas. Como se describe en la introducción de este trabajo (véase apartado 1.7) los estudios con imagen VSD de la corteza

somatosensorial en la región de las extremidades se han enfocado principalmente desde un punto de vista patológico; sin embargo, son numerosos los estudios realizados en condiciones naturales de la fisiología de la corteza de barriles. En dicha región cortical se ha demostrado que la activación por estimulación periférica puede alcanzar regiones bastante alejadas del foco principal de la activación (Petersen et al., 2003a). En el presente trabajo de tesis, hemos evaluado el alcance de la activación cortical, así como velocidades de activación y grado de solapamiento entre las regiones corticales activadas por estimulación de las distintas extremidades. Y esto se ha realizado para los dos niveles de intensidad de estimulación descritos a comienzos de este apartado (véanse Figura 4.10 y Tabla 5). Nuestros resultados han mostrado que los parámetros estudiados son diferentes bajo estímulos a baja y alta intensidad y entre estímulos en la extremidad delantera y en la extremidad trasera. Lo cual podría sugerir una cierta anisotropía anatómica cortical desde la extremidad delantera a la trasera y desde la extremidad trasera a la delantera. Globalmente, nuestros registros muestran grandes regiones de activación cortical, consistente con los amplios campos receptores de las neuronas piramidales de las capas supragranulares (Brecht et al., 2003) y con las conexiones horizontales de rango largo (Frostig et al., 2008; Bernardo et al., 1990; Armstrong-James et al., 1992). Pero además de una contribución cortico-cortical, la gran extensión de la activación cortical puede tener un origen subcortical. El origen subcortical de la activación cortical extensa puede suceder por la activación del tracto espinotalámico a la estimulación de alta intensidad, ya que estas neuronas hacen sinapsis en los núcleos más mediales del tálamo como el Pom que tienen sus dianas corticales precisamente en las capas supragranulares. Por lo tanto, la activación lenta y extensa que se observa por esta estimulación puede tener doble origen, la llegada tálamocortical desde núcleos de la vía paralemniscal y la dinámica córticocortical.

Una parte importante del presente trabajo ha sido el estudio detallado de las dinámicas de la activación en la corteza somatosensorial contralateral a la extremidad estimulada, desde el inicio de la activación hasta que la activación

alcanzaba su máxima extensión. Los resultados muestran una estructura espaciotemporal diferente entre en la activación de las regiones corticales correspondientes a las extremidades delantera y trasera (véanse Figura 4.11 y Tabla 6). Si bien en la primera se observa una clara propagación en dirección medial, en la segunda la propagación de la actividad se mantiene más uniformemente distribuida en todas direcciones, aunque con cierta tendencia medial. Este hecho parece reflejar la propagación de la actividad desde la corteza somatosensorial a la correspondiente corteza motora, consistentemente con las conocidas proyecciones desde corteza somatosensorial a corteza motora (Ferezou et al., 2007) y de acuerdo también con el hecho de que la mayor parte de la corteza somatosensorial correspondiente a la extremidad delantera está separada de la corteza motora, mientras que ambas cortezas solapan casi por completo en la representación de la extremidad trasera (Donoghue et al., 1979; Neafsey et al., 1986). Esta dinámica en la corteza somatosensorial de las extremidades es consistente con la corteza de barriles, en la cual también se observa la activación de la región somatosensorial seguida de la activación de la corteza motora (Ferezou et al., 2007; Mao et al., 2011).

Como parte final de este apartado, discutiremos lo que ocurre con la estimulación de las extremidades ipsilaterales, que aunque no ha sido una cuestión principal en este trabajo, el resultado ha sido novedoso. Como se mencionaba anteriormente, la estimulación de las extremidades ipsilaterales desencadenaba la activación de dos focos (véanse Figura 4.9 y Figura 4.12). Anatómicamente, dichos focos se corresponden probablemente con las regiones somatosensorial y motora. Ya que una activación de la zona motora en respuesta a estimulación eléctrica de las extremidades ipsilaterales ha sido reportada también por otro trabajo empleando la técnica de imagen VSD (Ghosh et al., 2009). Sin embargo, la ausencia de activación de la zona somatosensorial descrita en el mismo trabajo podría explicarse por la menor resolución temporal empleada (5ms frente a los 0.5 ms del presente trabajo) en el seguimiento de la activación que se describe en el trabajo de estos autores. La presencia de múltiples focos encontrados en nuestras investigaciones es

consistente con los múltiples orígenes corticales (Manzoni et al., 1980; Pelled et al., 2007; Shuler et al., 2001) y subcorticales (Armstrong-James & George, 1988b; Usunoff et al., 1999; Wree et al., 2005) de las respuestas ipsilaterales. Sin embargo, nuestros datos muestran que la activación ipsilateral tiene unas latencias tanto al inicio como al pico de activación mayores que las contralaterales (véanse Figura 4.9 y Tabla 3), lo que nos hace pensar que el origen de esta actividad es cortico-cortical. Es decir, si el origen fuera en su mayor parte subcortical (desde los núcleos mediales del tálamo que reciben desde las entradas espinotalámicas), la activación cortical sería casi simultánea. En los resultados que mostramos la diferencia de latencias es consistente con una secuencia temporal que lleve a activar primero la corteza contralateral al estímulo y posteriormente la información es enviada a través del cuerpo calloso a la corteza correspondiente ipsilateral.

Hemos dicho que la expansión de la activación de las regiones corticales contralaterales al lugar del estímulo periférico, alcanza regiones mediales correspondientes a la corteza motora. En el mismo sentido, realizamos la interpretación sobre la detección del foco de activación cortical ipsilateral en corteza motora, lo cual podría explicarse por la necesidad de integración sensorio-motora en cuadrúpedos.

Así pues, este trabajo aporta luz al conocimiento de la fisiología de las capas supragranulares de corteza sensorimotora en respuesta a estimulación de las extremidades en condiciones fisiológicas. Y sienta las bases de las dinámicas corticales en condiciones control que servirán como modelo con el que comprar e interpretar las dinámicas corticales que se pueden producir en situaciones patológicas experimentales como la lesión medular o el ictus, por ejemplo. Al mismo tiempo, nuestro trabajo destaca la importancia del uso de nuevas técnicas de registro para obtener un mejor conocimiento de las complejas dinámicas corticales en diferentes situaciones.

6. CONCLUSIONES

El presente trabajo experimental se centró en el estudio de la fisiología del sistema somatosensorial (a nivel talámico y cortical) en la representación de las extremidades y las vibrisas, así como de las activaciones corticales y los mapas que se obtienen en la corteza somatosensorial ante estímulos aplicados en las extremidades. Las principales conclusiones de este estudio son las siguientes:

1. El complejo ventrobasal del tálamo muestra una homogeneidad fisiológica en las respuestas neuronales correspondientes a las diferentes regiones corporales (vibrisas, extremidad anterior y extremidad posterior) ante estímulos periféricos de idénticas características.
2. En la discriminación y detección de estímulos en el complejo ventrobasal, la información extraída del componente temporal de las respuestas neuronales puede ser más alta que la información extraída de la magnitud de respuesta, estando contenida la mayor parte de dicha información temporal en el primer potencial de acción de cada respuesta neuronal.
3. La información temporal se puede extraer principalmente por las diferencias de latencia entre las respuestas a diferentes estímulos. Asimismo, la información temporal se ve disminuida por la presencia de jitter (variabilidad en la precisión temporal de la latencia) en las respuestas, excepto cuando las latencias de respuestas a diferentes estímulos son suficientemente pequeñas (cercanas a cero).
4. La activación cortical inicial por estimulación de las extremidades medida con imagen VSD es consistente con el mapa somatotópico conocido de la corteza somatosensorial primaria de la rata.
5. La dinámica de activación de la población neuronal en la corteza somatosensorial correspondiente a las extremidades muestra una estructura de propagación espaciotemporal diferente para la estimulación de cada extremidad.

6. La estimulación de una extremidad puede originar la activación de regiones corticales correspondientes a la otra extremidad, poniendo de manifiesto la importancia de la integración somatosensorial cortical en el procesamiento de la información sensorial procedente de las extremidades.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguilar JR, Castro-Alamancos MA. (2005) Spatiotemporal gating of sensory inputs in thalamus during quiescent and activated states. *J Neurosci.* 25(47):10990-1002.

Aguilar J, Humanes-Valera D, Alonso-Calviño E, Yague JG, Moxon KA, Oliviero A, Foffani G. (2010) Spinal cord injury immediately changes the state of the brain. *J Neurosci.* 30(22):7528-37.

Angel A, Clarke KA. (1975) An analysis of the representation of the forelimb in the ventrobasal thalamic complex of the albino rat. *J Physiol.* 249(2):399-423.

Armstrong-James M, Callahan CA. (1991) Thalamo-cortical processing of vibrissal information in the rat. II. spatiotemporal convergence in the thalamic ventroposterior medial nucleus (VPm) and its relevance to generation of receptive fields of S1 cortical "barrel" neurones. *J Comp Neurol.* 303(2):211-24.

Armstrong-James M, Fox K. (1987) Spatiotemporal convergence and divergence in the rat S1 "barrel" cortex. *J Comp Neurol.* 263(2):265-81.

Armstrong-James M, George MJ. (1988a) Influence of anesthesia on spontaneous activity and receptive field size of single units in rat Sm1 neocortex. *Exp Neurol.* 99(2):369-87.

Armstrong-James M, George MJ. (1988b) Bilateral receptive fields of cells in rat Sm1 cortex. *Exp Brain Res.* 70(1):155-65.

Armstrong-James M, Fox K, Das-Gupta A. (1992) Flow of excitation within rat barrel cortex on striking a single vibrissa. *J Neurophysiol.* 68(4):1345-58

Barbaresi P, Spreafico R, Frassoni C, Rustioni A. (1986) GABAergic neurons are present in the dorsal column nuclei but not in the ventroposterior complex of rats. *Brain Res.* 382: 305-26.

Berger T, Borgdorff A, Crochet S, Neubauer FB, Lefort S, Fauvet B, Ferezou I, Carleton A, Lüscher HR, Petersen CC. (2007) Combined voltage and calcium epifluorescence imaging in vitro and in vivo reveals subthreshold and suprathreshold dynamics of mouse barrel cortex. *J Neurophysiol.* 97(5):3751-62.

Bernardo KL, McCasland JS, Woolsey TA, Strominger RN (1990) Local intra- and interlaminar connections in mouse barrel cortex. *J Comp Neurol.* 291(2):231-55.

Brecht M, Roth A, Sakmann B. (2003) Dynamic receptive fields of reconstructed pyramidal cells in layers 3 and 2 of rat somatosensory barrel cortex. *J Physiol.* 553(Pt 1):243-65.

Brown CE, Aminoltejari K, Erb H, Winship IR, Murphy TH. (2009) In vivo voltage-sensitive dye imaging in adult mice reveals that somatosensory maps lost to stroke are replaced over weeks by new structural and functional circuits with prolonged modes of activation within both the peri-infarct zone and distant sites. *J Neurosci.* 29(6):1719-34.

Chapin JK, Lin CS. (1984) Mapping the body representation in the SI Cortex of anesthetized and awake rats. *J Comp Neurol.* 229:199-213.

Chapin JK, Waterhouse BD, Woodward DJ. (1981) Differences in cutaneous sensory response properties of single somatosensory cortical neurons in awake and halothane anesthetized rats. *Brain Res Bull.* 6(1):63-70.

Chemla S, Chavane F. (2010) A biophysical cortical column model to study the multi-component origin of the VSDI signal. *Neuroimage.* 53(2):420-38.

Civillico EF, Contreras D. (2006) Integration of evoked responses in supragranular cortex studied with optical recordings in vivo. *J Neurophysiol.* 96(1):336-51.

Cohen LB, Salzberg BM, Davila HV, Ross WN, Landowne D, Waggoner AS, Wang CH. (1974) Changes in axon fluorescence during activity: molecular probes of membrane potential. *J Membr Biol.* 19(1):1-36.

Contreras D, Llinas R. (2001) Voltage-sensitive dye imaging of neocortical spatiotemporal dynamics to afferent activation frequency. *J Neurosci.* 21(23):9403-13.

Dayan P, Abbott LF (2001) *Theoretical Neuroscience: Computational and mathematical modeling of neural systems.* Massachusetts Institute of Technology Press.

Delgado JM, Ferrús A, Mora F, Rubia FJ. *Manual de Neurociencia.* Editorial Síntesis SA, 1.ed. (10/1998).

Devonshire IM, Grandy TH, Dommett EJ, Greenfield SA. (2010) Effects of urethane anaesthesia on sensory processing in the rat barrel cortex revealed by combined optical imaging and electrophysiology. *Eur J Neurosci.* 32(5):786-97

Donoghue JP, Kerman KL, Ebner FF (1979) Evidence for two organizational plans within the somatic sensory-motor cortex of the rat. *J Comp Neurol.* 183(3):647-63.

Emmers R. (1965) Organization of the first and the second somesthetic regions (SI and SII) in the rat thalamus. *J Comp Neurol.* 124:215-27.

Erchova IA, Lebedev MA, Diamond ME. (2002) Somatosensory cortical neuronal population activity across states of anaesthesia. *Eur J Neurosci.* 15(4):744-52.

Ferezou I, Bolea S, Petersen CC. (2006) Visualizing the cortical representation of whisker touch: voltage-sensitive dye imaging in freely moving mice. *Neuron* 50(4):617-29.

Ferezou I, Haiss F, Gentet LJ, Aronoff R, Weber B, et al. (2007) Spatiotemporal dynamics of cortical sensorimotor integration in behaving mice. *Neuron* 56:907-923.

Foffani G, Moxon KA. (2004) PSTH-based classification of sensory stimuli using ensembles of single neurons. *J Neurosci Methods.* 30;135(1-2):107-20.

Francis JT, Xu S, Chapin JK. (2008) Propioceptive and cutaneous representations in the rat ventral posterolateral thalamus. *J Neurophysiol.* 99:2291-2304.

Frostig RD, Xiong Y, Chen-Bee CH, Kvasnák E, Stehberg J. (2008) Large-scale organization of rat sensorimotor cortex based on a motif of large activation spreads. *J Neurosci.* 28(49):13274-84.

Ghazanfar AA, Nicolelis MA. (1999) Spatiotemporal properties of layer V neurons of the rat primary somatosensory cortex. *Cereb Cortex.* 9:348-361.

Ghazanfar AA, Stambaugh CR, Nicolelis MA. (2000) Encoding of tactile stimulus location by somatosensory thalamocortical ensembles. *J Neurosci.* 20(10):3761-75.

Ghosh A, Haiss F, Sydekum E, Schneider R, Gullo M, Wyss MT, Mueggler T, Baltes C, Rudin M, Weber B, Schwab ME. (2010) Rewiring of hindlimb corticospinal neurons after spinal cord injury. *Nat Neurosci.* 13(1):97-104.

Ghosh A, Sydekum E, Haiss F, Peduzzi S, Zörner B, et al. (2009) Functional and anatomical reorganization of the sensory-motor cortex after incomplete spinal cord injury in adults rats. *J Neurosci.* 29:12210-12219.

Grinvald A, Hildesheim R. (2004) VSDI: a new era in functional imaging of cortical dynamics. *Nat Rev Neurosci.* 5(11):874-85.

Guic E, Carrasco X, Rodríguez E, Robles I, Merzenich MM. (2008) Non-homogeneous spatial configuration of vibrissae cortical representation in layer IV of the barrelsomatosensory cortex. *Biol Res.* 41(4):461-71.

Hartings JA, Temereanca S, Simons DJ. (2000) Processing of periodic whisker deflections by neurons in the ventroposterior medial and thalamic reticular nuclei. *J Neurophysiol.* 83(3):1158-66.

Haupt SS, Spengler F, Husemann R, Dinse HR (2004) Receptive field scatter, topography and map variability in different layers of the hindpaw representation of rat somatosensory cortex. *Exp Brain Res.* 155(4):485-99.

Hoffer ZS, Hoover JE, Alloway KD. (2003) Sensorimotor corticocortical projections from rat barrel cortex have an anisotropic organization that facilitates integration of inputs from whiskers in the same row. *J Comp Neurol.* 466(4):525-44.

Iwamura Y. (2009) Somatotopy and information processing in the somatosensory cortex. *Brain Nerve.* 61:1373-82.

Kleinfeld D, Delaney KR. (1996) Distributed representation of vibrissa movement in the upper layers of somatosensory cortex revealed with voltage-sensitive dyes. *J Comp Neurol.* 375(1):89-108.

Kyriazi HT, Carvell GE, Simons DJ. (1994) OFF response transformations in the whisker/barrel system. *J Neurophysiol.* 72(1):392-401.

Land PW, Buffer SA Jr, Yaskosky JD. (1995) Barreloids in adult rat thalamus: three-dimensional architecture and relationship to somatosensory cortical barrels. *J Comp Neurol.* 355(4):573-88.

Lee KH, Kim UJ, Park YG, Won R, Lee H, Lee BH. (2011) Optical imaging of somatosensory evoked potentials in the rat cerebral cortex after spinal cord injury. *J Neurotrauma.* 28(5):797-807.

Lippert MT, Takagaki K, Xu W, Huang X, Wu JY. (2007) Methods for voltage sensitive dye imaging of rat cortical activity with high signal-to-noise ratio. *J Neurophysiol.* 98(1):502-12.

Lilja J, Endo T, Hofstetter C, Westman E, Young J, Olson L, Spenger C. (2006) Blood oxygenation level-dependent visualization of synaptic relay stations of sensory pathways along the neuroaxis in response to graded sensory stimulation of a limb. *J Neurosci.* 26(23):6330-6.

London JA, Cohen LB, Wu JY. (1989) Optical recordings of the cortical response to whisker stimulation before and after the addition of an epileptogenic agent. *J Neurosci.* 9(6):2182-90.

Manzoni T, Barbaresi P, Bellardinelli E, Caminiti R. (1980) Callosal projections from the two body midlines. *Exp Brain Res.* 39(1):1-9.

Mao T, Kusefoglou D, Hooks BM, Huber D, Petreanu L, Svoboda K. (2011) Long-range neuronal circuits underlying the interaction between sensory and motor cortex. *Neuron*. 72(1):111-23.

McVea DA, Mohajerani MH, Murphy TH. (2012) Voltage-sensitive dye imaging reveals dynamic spatiotemporal properties of cortical activity after spontaneous muscle twitches in the newborn rat. *J Neurosci*. 32(32):10982-94.

Montemurro MA, Panzeri S, Maravall M, Alenda A, Bale MR, Brambilla M, Petersen RS. (2007) Role of precise spike timing in coding of dynamic vibrissa stimuli in somatosensory thalamus. *J Neurophysiol*. 98(4):1871-82.

Moxon KA, Hale LL, Aguilar J, Foffani G. (2008) Responses of infragranular neurons in the rat primary somatosensory cortex to forepaw and hindpaw tactile stimuli. *Neuroscience* 156: 1083-1092.

Neafsey EJ, Bold EL, Haas G, Hurley-Gius KM, Quirk G, Sievert CF, Terreberry RR (1986) The organization of the rat motor cortex: a microstimulation mapping study. *Brain Res Rev*. 11:77-96.

Nicolelis MA, Chapin JK. (1994) Spatiotemporal structure of somatosensory responses of many-neuron ensembles in the rat ventral posterior medial nucleus of the thalamus. *J Neurosci*. 14(6):3511-32.

Orbach HS, Cohen LB, Grinvald A. (1985) Optical mapping of electrical activity in rat somatosensory and visual cortex. *J Neurosci*. 5(7):1886-95.

Ortuño T, Grieve KL, Cao R, Cudeiro J, Rivadulla C. (2014) Bursting thalamic responses in awake monkey contribute to visual detection and are modulated by corticofugal feedback. *Front Behav Neurosci*. 8:198.

Panzeri S, Petersen RS, Schultz SR, Lebedev M, Diamond ME. (2001) The role of spike timing in the coding of stimulus location in rat somatosensory cortex. *Neuron* 29(3):769-77.

Pelled G, Chuang KH, Dodd SJ, Koretsky AP. (2007) Functional MRI detection of bilateral cortical reorganization in the rodent brain following peripheral nerve deafferentation. *Neuroimage* 37(1):262-73.

Penfield, WG y Rasmussen, TB. (1950) *The Cerebral Cortex of Man*. The Macmillan Company, New York.

Perea Bartolomé MV, Ladera Fernández V (2004) Neurofunctional aspects of the thalamus. *Rev Neurol* 38(7):687-93.

Petersen RS, Brambilla M, Bale MR, Alenda A, Panzeri S, Montemurro MA, Maravall M. (2008) Diverse and temporally precise kinetic feature selectivity in the VPM thalamic nucleus. *Neuron*. 60(5):890-903.

Petersen CC, Grinvald A, Sakmann B (2003a) Spatiotemporal dynamics of sensory responses in layer 2/3 of rat barrel cortex measured in vivo by voltage-sensitive dye imaging combined with whole-cell voltage recordings and neuron reconstructions. *J Neurosci*. 23(4):1298-309.

Petersen CC, Hahn TT, Mehta M, Grinvald A, Sakmann B. (2003b) Interaction of sensory responses with spontaneous depolarization in layer 2/3 barrel cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100(23):13638-43.

Petersen RS, Panzeri S, Diamond ME. (2001) Population coding of stimulus location in rat somatosensory cortex. *Neuron*. 32(3):503-14.

Pinto DJ, Brumberg JC, Simons DJ. (2000) Circuit dynamics and coding strategies in rodent somatosensory cortex. *J Neurophysiol*. 83(3):1158-66.

Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Katz LC, LaMantia AS, McNamara JO. (2001) *Invitación a la Neurociencia*. Madrid: Médica Panamericana.

Rasmusson DD, Webster HH, Dykes RW. (1992) Neuronal response properties within subregions of raccoon somatosensory cortex 1 week after digit amputation. *Somatosens Mot Res*. 9:279-89.

Sherman SM (2001) Tonic and burst firing: dual modes of thalamocortical relay. *Trends Neurosci*. 24(2):122-6.

Shoham D, Glaser DE, Arieli A, Kenet T, Wijnbergen C, Toledo Y, Hildesheim R, Grinvald A. (1999) Imaging cortical dynamics at high spatial and temporal resolution with novel blue voltage-sensitive dyes. *Neuron*. 24(4):791-802.

Shuler MG, Krupa DJ, Nicolelis MA. (2001) Bilateral integration of whisker information in the primary somatosensory cortex of rats. *J Neurosci*. 21(14):5251-61.

Sigler A, Mohajerani MH, Murphy TH. (2009) Imaging rapid redistribution of sensory-evoked depolarization through existing cortical pathways after targeted stroke in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106(28):11759-64.

Swadlow HA, Gusev AG (2001) The impact of 'bursting' thalamic impulses at a neocortical synapse. *Nat Neurosci*. 4(4):402-8.

Temereanca S, Brown EN, Simons DJ. (2008) Rapid changes in thalamic firing synchrony during repetitive whisker stimulation. *J Neurosci*. 28(44):11153-64.

Temereanca S, Simons DJ. (2003) Local field potentials and the encoding of whisker deflections by population firing synchrony in thalamic barreloids. *J Neurophysiol*. 89(4):2137-45.

Timofeeva E, Mérette C, Emond C, Lavallée P, Deschênes M. (2003) A map of angular tuning preference in thalamic barreloids. *J Neurosci*. 23(33):10717-23.

Tsytsarev V, Liao LD, Kong KV, Liu YH, Erzurumlu RS, Olivo M, Thakor NV. (2014) Recent progress in voltage-sensitive dye imaging for neuroscience. *J Nanosci Nanotechnol*. 14(7):4733-44.

Tsytsarev V, Pope D, Pumbo E, Yablonskii A, Hofmann M. (2010) Study of the cortical representation of whisker directional deflection using voltage-sensitive dye optical imaging. *Neuroimage*. 53(1):233-8.

Tutunculer B, Foffani G, Himes BT, Moxon KA. (2006) Structure of the excitatory receptive fields of infragranular forelimb neurons in the rat primary somatosensory cortex responding to touch. *Cereb Cortex* 16(6):791-810

Usunoff KG, Kharazia VN, Valtschanoff JG, Schmidt HH, Weinberg RJ. (1999) Nitric oxide synthase-containing projections to the ventrobasal thalamus in the rat. *Anat Embryol (Berl)*. 200(3):265-81.

Valverde F (2002). Estructura de la corteza cerebral. Organización intrínseca y análisis comparativo del neocórtex. *Rev Neurol* 34: 758-780.

Van der Loos H. (1976) Barreloids in mouse somatosensory thalamus. *Neurosci Lett*. 2: 1-6

Veinante P, Jacquin MF, Deschenes M (2000) Thalamic projections from the whisker-sensitive regions of the spinal trigeminal complex in the rat. *J Comp Neurol* 420: 233-243.

Wall PD & Dubner R (1972) Somatosensory pathways. *Annu Rev Physiol* 34:315-336.

Wallace DJ, Sakmann B. (2008) Plasticity of representational maps in somatosensory cortex observed by in vivo voltage-sensitive dye imaging. *Cereb Cortex*. 18(6):1361-73.

Waters RS, Li CX, McCandlish CA. (1995) Relationship between the organization of the forepaw barrel subfield and the representation of the forepaw in layer IV of rat somatosensory cortex. *Exp Brain Res*. 103(2):183-97.

Welker C. (1971) Microelectrode delineation of fine grain somatotopic organization of (Sml) cerebral neocortex in albino rat. *Brain Res*. 5;26(2):259-75.

Welker WI (1973) Principles of organization of the ventrobasal complex in mammals. *Brain Behav Evol*, 7:253–336.

Wise SP, Jones EG (1976) The organization and postnatal development of the commissural projection of the rat somatic sensory cortex. *J Comp Neurol*, 168:313-343.

Wree A, Itzev DE, Schmitt O, Usunoff KG. (2005) Neurons in the dorsal column nuclei of the rat emit a moderate projection to the ipsilateral ventrobasal thalamus. *Anat Embryol (Berl)*.210(3):155-62.

Záborszky L, Wolff JR (1982) Distribution patterns and individual variations of callosal connections in the albino rat. *Anat Embryol (Berl)*.165:213-32.

8. ANEXOS

Con el objetivo de aumentar el conocimiento actual sobre la fisiología del sistema somatosensorial en la representación de las extremidades a nivel talámico y a nivel cortical, exponemos el siguiente conjunto de publicaciones, las cuales contienen los principales resultados de la presente tesis.

La **primera publicación** (Aguilar J, Morales-Botello ML, Foffani G, 2008) estudia en detalle la fisiología de neuronas registradas en el complejo ventrobasal talámico, el cual se compone del núcleo VPM donde se reciben las entradas sensoriales desde las vibrisas, y del núcleo VPL donde se reciben las entradas sensoriales desde las extremidades y el tronco. Estos registros se obtuvieron extracelularmente en ratas anestesiadas. En este trabajo se concluye que las neuronas del complejo ventrobasal son homogéneas fisiológicamente, es decir, que muestran respuestas con las mismas características fisiológicas cuando son sometidas al mismo tipo de estímulo táctil, independientemente de si pertenecen a la región corporal de vibrisas (VPM), de la extremidad delantera o de la extremidad trasera (VPL). La **segunda publicación** (Foffani G, Morales-Botello ML, Aguilar J, 2009) analiza los aspectos temporales del código neural, mediante análisis de información y experimentos computacionales realizados sobre los registros electrofisiológicos anteriores. Este trabajo manifiesta como la homogeneidad del complejo ventrobasal talámico es extensible también en términos de información, y muestra que los aspectos temporales de las respuestas pueden aportar más información que la magnitud de las mismas.

Así pues, los trabajos anteriores aportan en conjunto una amplia descripción en términos fisiológicos y de información de las regiones talámicas que representan a las extremidades, comparándose a su vez con las más estudiadas regiones que representan a las vibrisas. La falta de conocimiento sobre la fisiología en la representación talámica de las extremidades era también extensible a la corteza. Asimismo, a nivel cortical la mayor parte de los estudios han sido referidos a capas granular e infragranular, sin embargo, las capas supragranulares juegan un papel muy importante en el procesamiento sensorimotor. Por ello, la **tercera publicación** (Morales-Botello ML, Aguilar J, Foffani G, 2012) aborda el estudio de las dinámicas de activación

espaciotemporal de las capas supragranulares en respuesta a estimulación de las extremidades de la rata, empleando para ello "voltage-sensitive-dye imaging". Este trabajo pone de manifiesto importantes diferencias somatotópicas entre los mapas contralaterales e ipsilaterales, si bien, la estimulación de las extremidades contralaterales origina la activación inicial de un solo foco en la correspondiente corteza somatosensorial primaria, la estimulación de las extremidades ipsilaterales origina la activación inicial de dos focos, no coincidentes con la activación por estimulación contralateral. Este trabajo muestra también diferencias en las dinámicas espacio-temporales de activación en respuesta a estimulación de las extremidades delanteras y traseras, mientras la estimulación de las extremidades delanteras produce una activación cuyo centro se expande rápidamente en dirección medial, la estimulación de las extremidades traseras produce una activación que se expande más uniformemente, sin una clara direccionalidad. Este estudio proporciona así una completa descripción de las dinámicas espacio-temporales de activación de la corteza somatosensorial supragranular de la rata en respuesta a estimulación de las extremidades.

El conjunto de las tres publicaciones permite un mayor conocimiento de la fisiología talámica y cortical relativa a las señales procedentes de las extremidades, cumpliendo así los objetivos planteados en la presente tesis.

Tactile responses of hindpaw, forepaw and whisker neurons in the thalamic ventrobasal complex of anesthetized rats

J. Aguilar, M. L. Morales-Botello and G. Foffani

Neurosignals Group, Fundación del Hospital Nacional de Paraplégicos para la Investigación y la Integración, SESCAM, Finca La Peraleda s/n, 45071, Toledo, Spain

Keywords: receptive field, single neuron, thalamocortical, tuning, ventrobasal complex

OnlineOpen: This article is available free online at www.blackwell-synergy.com

Abstract

The majority of studies investigating responses of thalamocortical neurons to tactile stimuli have focused on the whisker representation of the rat thalamus: the ventral–posterior–medial nucleus (VPM). To test whether the basic properties of thalamocortical responses to tactile stimuli could be extended to the entire ventrobasal complex, we recorded single neurons from the whisker, forepaw and hindpaw thalamic representations. We performed a systematic analysis of responses to stereotyped tactile stimuli – 500 ms pulses (i.e. ON–OFF stimuli) or 1 ms pulses (i.e. impulsive stimuli) – under two different anesthetics (pentobarbital or urethane). We obtained the following main results: (i) the tuning of cells to ON vs. OFF stimuli displayed a gradient across neurons, so that two-thirds of cells responded more to ON stimuli and one-third responded more to OFF stimuli; (ii) on average, response magnitudes did not differ between ON and OFF stimuli, whereas latencies of response to OFF stimuli were a few milliseconds longer; (iii) latencies of response to ON and OFF stimuli were highly correlated; (iv) responses to impulsive stimuli and ON stimuli showed a strong correlation, whereas the relationship between the responses to impulsive stimuli and OFF stimuli was subtler; (v) unlike ON responses, OFF responses did not decrease when stimuli were moved from the receptive field center to a close location in the excitatory surround. We obtained the same results for hindpaw, forepaw and whisker neurons. Our results support the view of a neurophysiologically homogeneous ventrobasal complex, in which OFF responses participate in the structure of the spatiotemporal receptive field of thalamocortical neurons for tactile stimuli.

Introduction

The ventrobasal complex, which is composed of the ventral–posterior–lateral nucleus (VPL) and ventral–posterior–medial nucleus (VPM) of the thalamus, receives tactile information from the entire surface of the body (Wall & Dubner, 1972; Welker, 1973). Tactile stimuli produce excitatory inputs on thalamocortical neurons of the ventrobasal complex through lemniscal projections (Andersen *et al.*, 1964) and indirect inhibitory inputs through the thalamic reticular nucleus (Scheibel & Scheibel, 1966; Minderhoud, 1971; Houser *et al.*, 1980). The balance between excitatory and inhibitory inputs therefore shapes the responses of thalamocortical neurons to tactile stimuli.

The rat represents a particularly convenient animal model with which to investigate the responses of thalamocortical neurons to tactile stimuli. In fact, unlike that of other species, the rat ventrobasal complex is composed only of purely sensory excitatory cells without interneurons (Saporta & Kruger, 1977; Barbaresi *et al.*, 1986; Harris & Hendrickson, 1987). In addition, the rat trigeminal system offers an elegant spatial paradigm, the whisker pad, for investigating thalamo-

cortical tactile responses. For this reason, the great majority of rat studies have focused on the trigeminal thalamus, the VPM (Castro-Alamancos, 2004). However, the extent to which the rat ventrobasal complex can be considered anatomically and neurophysiologically homogeneous (Emmers, 1965; Peschanski *et al.*, 1984) is not completely clear.

The principal aim of the present work was to compare thalamocortical responses to tactile stimuli across hindpaw neurons, forepaw neurons and whisker neurons, recorded under two different anesthetics (urethane or pentobarbital). Previous studies have typically used either impulsive stimuli, i.e. stimuli of short duration (≤ 10 ms) that produce a simple response (Armstrong-James & Callahan, 1991; Friedberg *et al.*, 1999; Canedo & Aguilar, 2000; Castro-Alamancos, 2002; Khatri *et al.*, 2004; Aguilar & Castro-Alamancos, 2005; Hirata *et al.*, 2006; Higley & Contreras, 2007; Li & Ebner, 2007), or ON–OFF stimuli, i.e. stimuli of longer duration (≥ 100 ms) that produce a more complex response, called an ON–OFF response (Simons & Carvell, 1989; Nicolelis *et al.*, 1993; Kyriazi *et al.*, 1994; Nicolelis & Chapin, 1994; Ghazanfar *et al.*, 2001; Brecht & Sakmann, 2002; Bruno *et al.*, 2003; Minnery *et al.*, 2003; Timofeeva *et al.*, 2003; Temereanca & Simons, 2004). Relatively little attention has been devoted to OFF responses (Kyriazi *et al.*, 1994; Brecht & Sakmann, 2002; Minnery *et al.*, 2003). Here we performed a systematic comparison between ON responses, OFF responses and impulsive

Correspondence: Dr J. Aguilar, as above.
E-mail: jaguilar@sescam.jccm.es

Re-use of this article is permitted in accordance with the Creative Commons Deed, Attribution 2.5, which does not permit commercial exploitation.

Received 29 August 2007, revised 28 November 2007, accepted 29 November 2007

responses to tactile stimuli in the same population of thalamocortical neurons.

Materials and methods

Animals and surgery

All animal experiments described here conformed to the International Council for Laboratory Animal Science, European Union regulation 86/609/EEC, and were approved by the Ethical Committee for Animal Research of Hospital Nacional de Paraplégicos (Toledo, Spain). Data were obtained from 13 male rats (250–350 g). Animals were anesthetized with intraperitoneal pentobarbital (50 mg/kg) or with intraperitoneal urethane (1.5 g/kg). These anesthetics were chosen because of their well-established use for studying the receptive field properties of thalamocortical neurons in the rat. Once the anesthesia had taken complete effect, animals were placed in a stereotaxic frame (SR-6R; Narishige Scientific Instruments, Tokyo, Japan). Lidocaine 2% was applied over body surfaces in contact with the frame and over the area of the incision. The skin of the head was softly removed from the top of the skull, and a large craniotomy was performed on the right side of the midline [AP = 1 to -4; L = 1–4; atlas of Paxinos & Watson (1986)] in order to facilitate access to the somatosensory thalamus (Fig. 1A). Small incisions were made in the dura mater to permit the placement of recording electrodes into the brain. In order to prepare the whiskers for stimulation, the whisker pad was cut at 1 cm from the skin. The temperature of animals was kept constant at 36.5 °C with an automatically controlled heating pad.

Electrophysiology

Extracellular single-unit recordings were obtained from the rat thalamus using tungsten electrodes with 4 M Ω impedance (TM31C40KT of WPI, Inc., Sarasota, FL, USA). An additional electrode was inserted in the somatosensory cortex for continuously recording electroencephalograph signals, which were used to monitor the effect of anesthesia (Fig. 1B). The level of anesthesia was kept constant at stage III-3 (Friedberg *et al.*, 1999) throughout the course of the experiments by applying supplemental doses when required (1/4 of original doses for both anesthetics). The experiments were performed under a predominant frequency of cortical electroencephalograph of 3–4 Hz (Fig. 1B, bottom), which represents a less synchronized state as compared to the deeper anesthesia levels characterized by rhythmic bursts at lower frequencies (Fig. 1B, top). If rhythmic bursts were detected during the experimental protocol, the stimulation protocol was aborted. Stage III-3 is a rather stable state in which thalamocortical neurons display relatively large (i.e. multiwhisker or multidigit) receptive fields. At deeper levels of anesthesia, thalamocortical neurons display minimal receptive fields (e.g. only one whisker), and therefore the neural responses lose much of their spatiotemporal complexity (Friedberg *et al.*, 1999). At lighter levels of anesthesia, animals display spontaneous whisker movements, and thalamocortical neurons increase the size of their receptive fields and the spatiotemporal complexity of their responses (Friedberg *et al.*, 1999), which become maximal in activated states (Aguilar & Castro-Alamancos, 2005) and in awake animals (Nicoletis & Chapin, 1994). Stage III-3 therefore offers good experimental conditions for consistently recording neurons through long stimulation protocols and for retaining at least part of the spatiotemporal complexity that characterizes the responses of thalamocortical neurons.

Tactile responses in the ventrobasal complex 379

All recordings were amplified and filtered (1 Hz to 3 kHz) using a modular system composed of a preamplifier, filter and amplifier (Neurolog; Digitimer Ltd). Analog signals were converted into digital data at a 20 kHz sampling rate and with 16-bit quantization using a CED Power 1401 (Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK) controlled by Spike2 software (v5.03; Cambridge Electronic Design). Signals were stored in the hard disk of a PC for subsequent analysis.

Thalamic single-unit recordings were obtained from the VPM and VPL (AP = -2.3 to -4; L = 2–4; D = 5–7) (Fig. 1A). We studied the responses to whisker stimulation for VPM neurons and responses to cutaneous stimulation in forepaw or hindpaw for VPL neurons. Each experiment consisted of one or two electrode tracks and between one and three recording sites per track, depending on the time required to isolate good neurons and to achieve the suitable physiological conditions. Once a neuron was isolated, the first step was to identify the body region (whiskers, forepaw, or hindpaw) where a slight touch with a paintbrush produced a consistent cellular response. The VPM is located dorsal and medial in the somatosensory thalamus, and the VPL is located just behind, more ventral and lateral, making a small curve from lateral to medial around the VPM base (Fig. 1A). Moving down the electrode into the somatosensory thalamus, it was possible to isolate neurons with receptive fields located in the whiskers, in the forepaw, and finally in the hindpaw (Emmers, 1965; Waite, 1973a; Vahle-Hinz & Gottschaldt, 1983).

At the majority of recording sites ($n = 24$ sites), only a single neuron was isolated. The signal-to-noise ratio was verified to be >10 , considering the peak of the spike as signal and the standard deviation of the background as noise. At some recording sites, it was possible to isolate either two single neurons ($n = 7$ sites) or three single neurons ($n = 1$ site). The signal-to-noise ratio was always >10 for the first neuron and >5 for secondary neurons (Fig. 1C). Discrimination between neurons was meticulously achieved with off-line analysis, using voltage threshold methods and spike-sorting protocols in a complementary way, after digitally bandpass filtering the signals between 300 Hz and 3 kHz (Fig. 1C). Overall, we recorded and discriminated a total of 41 well-isolated neurons. The quality of single-neuron recordings was checked throughout the experiments in order to keep the signal-to-noise ratio and the physiological conditions as stable as possible. The total recording time for each single neuron ranged between 1 h and 3 h.

Tactile stimulation

Once a neuron was isolated and classified as VPM, forepaw VPL or hindpaw VPL, the protocols for tactile stimulation were applied. First, we located the receptive field center, defined as the whisker or cutaneous area that consistently elicited the response with greater magnitude (number of spikes/stimulus) and shorter latency (Aguilar & Castro-Alamancos, 2005). In all cells ($n = 41$), we applied an ON-OFF stimulation protocol, which consisted of a set of 100 stimuli of 0.5 Hz frequency and 500 ms duration, delivered to the receptive field center of each cell. Whiskers were stimulated in their preferred direction along the dorsal-ventral axis (Lee *et al.*, 1994; Friedberg *et al.*, 1999). The dorsal-ventral preferred direction was empirically estimated with a hand-held probe before the stimulation protocol.

In a subset of cells ($n = 32$), we also applied a stimulation protocol with impulsive stimuli, which consisted of a set of 100 stimuli of 0.5 Hz frequency and 1 ms duration, again delivered to the receptive field center of each cell. Thus, impulsive stimuli were delivered to the same whisker or to the same cutaneous area used for ON-OFF stimuli in each cell. Note that ON-OFF stimuli and impulsive stimuli

380 J. Aguilar *et al.*

represent two extremes of the same stimulation pattern: trains of square pulses with long pulse duration (500 ms) or with short pulse duration (1 ms), respectively. In other words, an impulsive stimulus is a very short ON–OFF stimulus.

In a further subset of cells ($n = 12$), we also applied the ON–OFF stimulation protocol to a responsive surround location, i.e. an adjacent whisker or an adjacent digit.

All stimuli were generated using a Master8 electrical stimulator (A.M.P.I., Jerusalem, Israel) with an ISO-Flex stimulus isolator (A.M.P.I.). Electrical pulses were delivered to a custom-made piezoelectric sensor attached to a rigid tungsten bar (0.5 mm in diameter, 2.5 cm long, with the tip curved at 90° for 5 mm). The piezoelectric sensor transduces electrical pulses into mechanical movements, whose range depends on the voltage. We used a voltage of 90 V, which imposed a final vertical movement of 0.5 mm to the tungsten bar. The tungsten bar was situated manually under microscopic control (Leica M300; Leica Microsystems) just a few micrometers over, but never touching, the whisker or the cutaneous area selected previously. Because even in deeply anesthetized conditions thalamocortical neurons can consistently respond to somatosensory stimuli at frequencies of 1 Hz (Castro-Alamancos, 2002; Aguilar & Castro-Alamancos, 2005), the frequency of 0.5 Hz was conservatively chosen to avoid adaptation. The output of the Master8 stimulator was sent to the CED Power 1401 and recorded in Spike2 together with the signals in order to trigger the subsequent data analysis.

Data analysis

Data analyses were based on two main measures extracted from the peristimulus time histograms of single-neuron responses: the response magnitude, calculated as the averaged number of spikes/stimulus, and the response latency, calculated as the time interval between the onset of the stimulus and the onset of the neural response. The latency of OFF responses was calculated from the offset of the stimulus pulse. Peristimulus time histograms were estimated with a 1 ms bin size. We also introduced a dimensionless index, ON–OFF tuning, which is a magnitude index that quantifies how much a cell is tuned to ON stimuli as compared to OFF stimuli. It was defined as $RM_{ON}/(RM_{ON} + RM_{OFF})$, where RM_{ON} indicates the magnitude of response to ON stimuli and RM_{OFF} indicates the magnitude of response to OFF stimuli, both expressed in spikes/stimulus. Finally, we estimated the spontaneous firing rate of each neuron by averaging the spikes per unit time in a 200 ms window before each ON stimulus, before each OFF stimulus, and before each impulsive stimulus, to compare the neurophysiological states of neurons and to confirm the stability of recordings across stimulation protocols. All measures were exported to Matlab (version 6.5; The Mathworks) for statistical analysis.

ON responses and OFF responses in the ventrobasal complex

To compare the responses to ON–OFF stimuli between neurons in different representations of the ventrobasal complex (VPM, forepaw

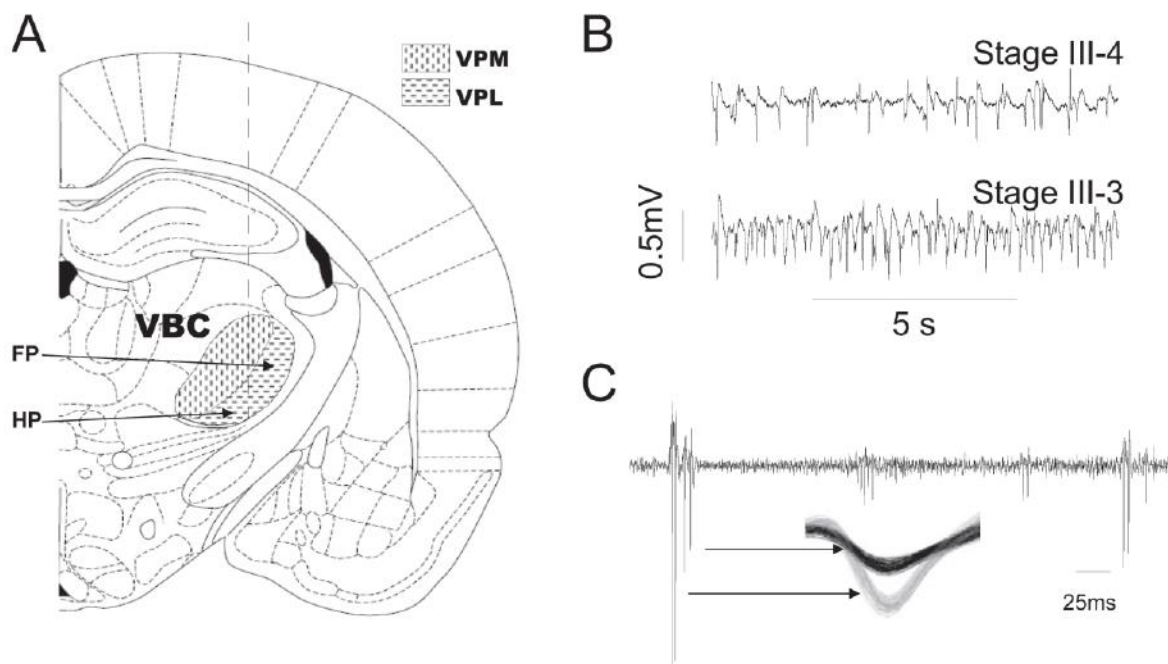


FIG. 1. Experimental procedures. (A) Diagram of a coronal section of the right hemisphere at -3.14 mm from Bregma [modified from Paxinos & Watson (1986)]. The ventrobasal complex (VBC) is indicated by a thick, continuous line. Inside the VBC it is possible to differentiate between the ventral-posterior-medial nucleus (VPM), which represents the whiskers, and the ventral-posterior-lateral nucleus (VPL), which represents the rest of the body. The forepaw (FP) representation is located in the dorsolateral portion of the VPL, and the hindpaw representation (HP) in the ventromedial portion. The thick dashed line indicates a representative electrode track passing through the VPM and the VPL. (B) Cortical field potentials recorded from the same animal under deep anesthesia (stage III-4, upper plot) and under lighter anesthesia (stage III-3, lower plot). The lighter level of anesthesia was used for all the experiments. (C) Discrimination of two well-isolated single neurons recorded from the same electrode. The trace shows the presence of at least three neurons. The inset (800 μ s width) shows representative waveforms of the neuron with higher spike amplitude (gray lines) and of the neuron with intermediate spike amplitude (black lines). The neuron with smaller amplitude was not discriminated, because it did not fulfil our minimum criteria in terms of signal-to-noise ratio.

VPL, hindpaw VPL) and between different anesthetics (pentobarbital or urethane), magnitudes and latencies of ON responses and OFF responses and the ON-OFF tuning were separately entered into a two-way independent measures analysis of variance (ANOVA). The first main factor of the ANOVA was the body representation of the neuron, with three levels: whiskers, forepaw, or hindpaw. The second main factor was the anesthetic, with two levels: pentobarbital or urethane.

Comparisons between ON responses and OFF responses

ON responses and OFF responses were compared within cells, using paired *t*-tests. We also tested the correlations in magnitude and latency between ON responses and OFF responses using the Pearson correlation coefficient.

ON-OFF responses and impulsive responses

We compared the responses to impulsive stimuli between neurons in different representations of the ventrobasal complex (VPM, forepaw VPL, hindpaw VPL) and between different anesthetics (pentobarbital or urethane), using the same ANOVA design previously described for ON-OFF responses. We then performed three analyses to compare the

responses of neurons to ON-OFF stimuli and to impulsive stimuli. First, we investigated whether the magnitudes of impulsive responses were different from the magnitudes of ON responses or from the summed magnitudes of ON responses and OFF responses, using paired *t*-tests. Second, we verified the hypothesis of the magnitudes and latencies of impulsive responses being correlated with the magnitudes and latencies of ON responses and OFF responses, using the Pearson correlation coefficient. Finally, we tested whether the ON-OFF tuning could be used to predict the preference of a neuron, in terms of response magnitude, to ON stimuli as compared to impulsive stimuli. To this end, we tested whether the ON-OFF tuning correlated with the ratio between the magnitude of response to impulsive stimuli and the magnitude of response to ON stimuli, again using the Pearson correlation coefficient.

Spatial structure of ON-OFF responses

To investigate whether the spatial structure of OFF responses parallels the spatial structure of ON responses, we tested whether three main measures – the magnitude of ON responses, the magnitude of OFF responses, and the ON-OFF tuning – decrease when moving the stimulus from the center of the neuron's receptive field to a responsive

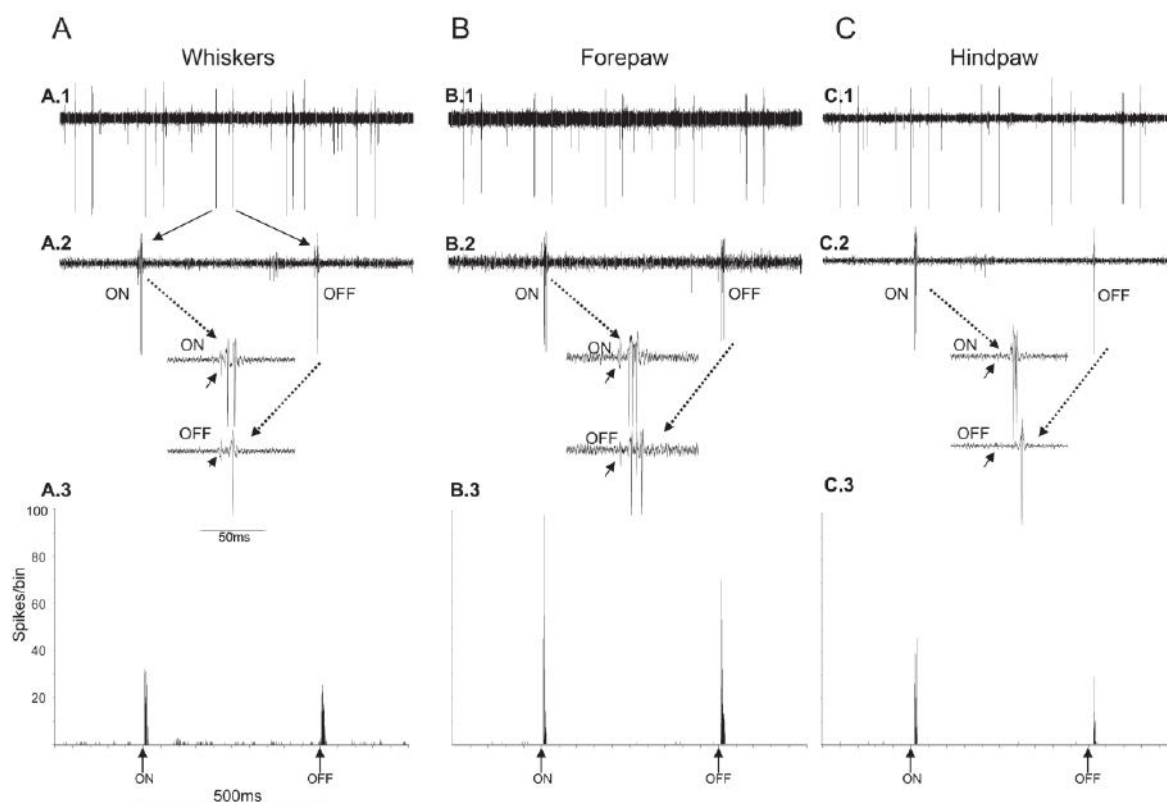


FIG. 2. Comparing ON-OFF responses in the ventrobasal complex. (A) Representative ventral-posterior-medial nucleus (VPM) neuron responding to the deflection of its principal whisker. (B) Representative ventral-posterior-lateral nucleus (VPL) forepaw neuron responding to tactile stimulation of its receptive field center. (C) Representative VPL hindpaw neuron responding to tactile stimulation of its receptive field center. Upper plots (A1, B1, C1) show 10 s continuous recordings, middle plots (A2, B2, C2) represent 1 s recordings with responses to single ON-OFF stimuli of 500 ms duration, and lower plots (A3, B3, C3) show the corresponding peristimulus time histograms from 100 stimuli.

TABLE 1. Summary of response magnitudes and latencies of thalamocortical neurons to ON, OFF and impulsive stimuli

| | Response magnitude (spikes/stimulus) | Response latency (ms) |
|--------------------------|---|--------------------------|
| ON | | |
| Hindpaw (<i>n</i> = 15) | 1.63 ± 0.61 | 11.0 ± 2.3 |
| Forepaw (<i>n</i> = 16) | 1.60 ± 1.00 | 7.1 ± 1.6 |
| Whiskers (<i>n</i> = 8) | 1.17 ± 0.54 | 4.6 ± 0.9 |
| All (<i>n</i> = 39) | 1.52 ± 0.79 | 8.1 ± 3.0 |
| OFF | | |
| Hindpaw (<i>n</i> = 12) | 1.47 ± 1.23 | 14.1 ± 3.9 |
| Forepaw (<i>n</i> = 13) | 1.25 ± 0.77 | 9.1 ± 3.1 |
| Whiskers (<i>n</i> = 7) | 1.18 ± 0.59 | 5.1 ± 1.7 |
| All (<i>n</i> = 32) | 1.32 ± 0.92 | 10.1 ± 4.7 |
| Impulse | | |
| Hindpaw (<i>n</i> = 13) | 1.61 ± 0.57 | 11.2 ± 2.3 |
| Forepaw (<i>n</i> = 11) | 1.38 ± 0.59 | 6.8 ± 1.5 |
| Whiskers (<i>n</i> = 8) | 1.18 ± 0.56 | 4.5 ± 0.9 |
| All (<i>n</i> = 32) | 1.43 ± 0.58 | 8.0 ± 3.3 |

Values are means ± SD.

surround location (adjacent whisker or adjacent digit), using paired *t*-tests.

Results were considered significant at $P < 0.05$. Values are given as mean ± SD.

Results

ON responses

We recorded a total of 41 well-discriminated single neurons from the rat somatosensory thalamus responding to tactile stimuli. The spontaneous firing rate of neurons calculated immediately before ON stimuli was 1.9 ± 2.8 Hz and was not significantly different (unpaired *t*-test, $P = 0.33$) between neurons recorded under pentobarbital anesthesia ($n = 22$) and neurons recorded under urethane anesthesia ($n = 19$). Almost all neurons (39 of 41) were excited by ON stimuli (Fig. 2). Response magnitudes and latencies are reported in Table 1. Response magnitudes were similar between hindpaw neurons, forepaw neurons, and whisker neurons (ANOVA, $P = 0.32$),

but were greater in neurons recorded under pentobarbital anesthesia (1.81 ± 0.89 spikes/stimulus) than in neurons recorded under urethane anesthesia (1.21 ± 0.52 spikes/stimulus; ANOVA, $P = 0.0393$). Response latencies were shorter in whisker neurons than in forepaw neurons, and shorter in forepaw neurons than in hindpaw neurons (ANOVA, $P = 0.00002$), which is consistent with the expected differences in the time required to reach the brainstem from the different stimulation sites. Latencies of response to ON stimuli did not differ between neurons recorded under pentobarbital anesthesia and neurons recorded under urethane anesthesia (ANOVA, $P = 0.89$).

OFF responses

The spontaneous firing rate of neurons calculated immediately before OFF stimuli was 2.8 ± 3.2 Hz and was not significantly different between neurons recorded under pentobarbital anesthesia and neurons recorded under urethane anesthesia (unpaired *t*-test, $P = 0.27$). Most neurons (32 of 39) were excited by OFF stimuli (Fig. 2). Response magnitudes and latencies are reported in Table 1. Again, magnitudes of response to OFF stimuli were similar between hindpaw neurons, forepaw neurons, and whisker neurons (ANOVA, $P = 0.99$). Response magnitudes tended to be greater in neurons recorded under pentobarbital anesthesia, but the difference was not statistically significant (ANOVA, $P = 0.14$). Similarly to the latencies of response to ON stimuli, the latencies of response to OFF stimuli were shorter in whisker neurons than in forepaw neurons, and shorter in forepaw neurons than in hindpaw neurons (ANOVA, $P = 0.00002$). Latencies of response to OFF stimuli tended to be longer under pentobarbital anesthesia than under urethane anesthesia, but again, the difference did not reach significance (ANOVA, $P = 0.0764$).

ON-OFF tuning

Overall, 66% of neurons were tuned to ON stimuli, and the remaining 33% of neurons (13 of 39) were tuned to OFF stimuli. Importantly, we found neurons tuned to OFF stimuli across the entire ventrobasal complex: five of 15 hindpaw neurons, four of 16 forepaw neurons, four of eight whisker neurons. Statistical analysis showed that the ON-OFF tuning was distributed similarly across neurons recorded under pentobarbital anesthesia (0.66 ± 0.26) as

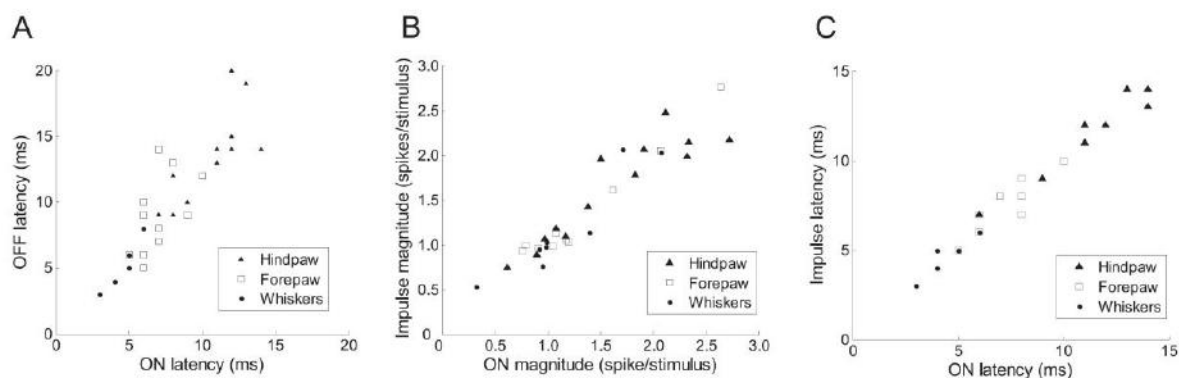


FIG. 3. Correlations between ON responses, OFF responses and impulsive responses. (A) Correlation between the latency of ON responses (x-axis) and the latency of OFF responses (y-axis). (B) Correlation between the magnitude of ON responses (x-axis) and the magnitude of impulsive responses (y-axis). (C) Correlation between the latency of ON responses (x-axis) and the latency of impulsive responses (y-axis). Note that the total number of points in the plots is less than the total number of neurons because some neurons had identical latencies or magnitudes.

across neurons recorded under urethane anesthesia (0.62 ± 0.22) (ANOVA, $P = 0.70$), and was similar in hindpaw neurons (0.68 ± 0.24), forepaw neurons (0.64 ± 0.24) and whisker neurons (0.56 ± 0.21) recorded across the ventrobasal complex (ANOVA, $P = 0.35$).

Comparisons between ON responses and OFF responses

The spontaneous firing rate calculated immediately before OFF stimuli was significantly greater than the spontaneous firing rate calculated immediately before ON stimuli (paired t -test, $P = 0.0025$). When we compared OFF responses to ON responses, response magnitudes were not significantly different between ON and OFF stimuli (paired t -test, $P = 0.30$), whereas latencies of response to OFF stimuli were significantly longer than those in response to ON stimuli (paired t -test, $P = 0.00002$) (Fig. 2), both under pentobarbital anesthesia (paired t -test, $P = 0.0004$) and under urethane anesthesia (paired t -test, $P = 0.0035$). The difference between the latency of OFF responses and the latency of ON responses was more evident under pentobarbital anesthesia (3.6 ± 2.8 ms) than under urethane anesthesia (1.0 ± 1.1 ms; paired t -test, $P = 0.0158$).

Magnitudes of response to OFF stimuli and to ON stimuli displayed a weak but significant correlation (Pearson, $r = 0.43$, $P = 0.0138$). Latencies of response to OFF stimuli and to ON stimuli were strongly

correlated ($r = 0.88$, $P < 0.000001$), both under pentobarbital anesthesia ($r = 0.86$, $P = 0.00002$) and under urethane anesthesia ($r = 0.95$, $P < 0.000001$). The correlation between ON and OFF latencies was consistent for hindpaw neurons ($r = 0.75$, $P = 0.0046$), forepaw neurons ($r = 0.61$, $P = 0.0271$), and whisker neurons ($r = 0.96$, $P = 0.0006$) (Fig. 3A).

Impulsive responses

In a subset of 32 neurons, we also studied the responses to impulsive stimuli. All neurons responded to impulsive stimuli. Response magnitudes and latencies are reported in Table 1. The analysis of impulsive responses confirmed the results obtained with ON responses. Response magnitudes were similar between hindpaw neurons, forepaw neurons, and whisker neurons (ANOVA, $P = 0.23$), but were greater in neurons recorded under pentobarbital anesthesia (1.71 ± 0.58 spikes/stimulus) than in neurons recorded under urethane anesthesia (1.23 ± 0.52 spikes/stimulus; ANOVA, $P = 0.0316$). Response latencies were shorter in whisker neurons than in forepaw neurons, and shorter in forepaw neurons than in hindpaw neurons (ANOVA, $P < 0.00001$). Response latencies did not differ between neurons recorded under pentobarbital anesthesia and neurons recorded under urethane anesthesia (ANOVA, $P = 0.49$).

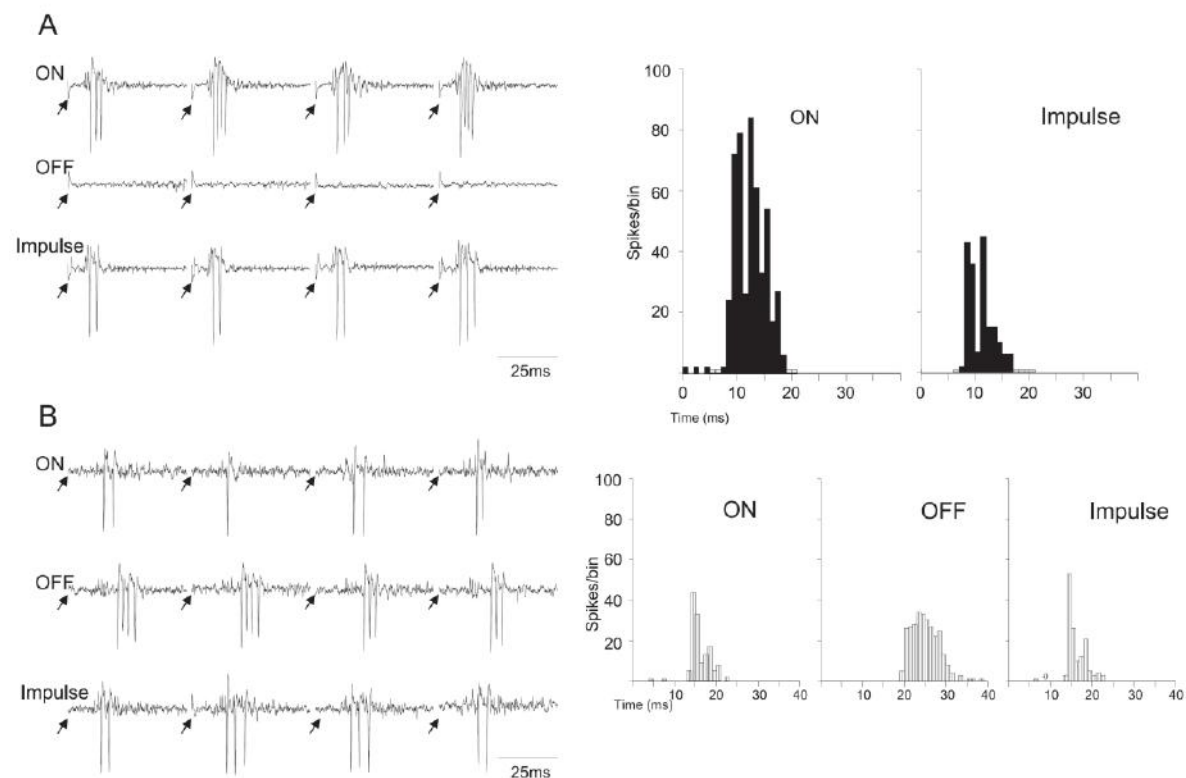


FIG. 4. ON-OFF responses and impulsive responses. (A) Representative thalamocortical neuron displaying strong ON responses, no OFF responses and impulsive responses smaller than the ON responses. (B) Representative thalamocortical neuron displaying weak ON responses, strong OFF responses and impulsive responses greater than the ON responses. The five plots on the right represent the corresponding peristimulus time histograms for 100 stimuli. The neurons in A and B were recorded, respectively, from the forepaw and hindpaw representations of the ventrobasal complex.

Comparison between impulsive responses and ON–OFF responses

The spontaneous firing rate calculated immediately before impulsive stimuli was not different from the spontaneous firing rate calculated immediately before ON stimuli (paired *t*-test, $P = 0.96$). The comparison between impulsive responses and ON–OFF responses revealed that the average magnitudes of response to impulsive stimuli were much smaller than the sum of magnitudes of response to ON and OFF stimuli (paired *t*-test, $P < 0.00001$), being instead remarkably similar to the magnitudes of response to ON stimuli alone (paired *t*-test, $P = 0.44$). Indeed, magnitudes of response to impulsive stimuli correlated well with the magnitudes of response to ON stimuli (Pearson, $r = 0.76$, $P < 0.00001$). This was true for hindpaw neurons ($r = 0.91$, $P = 0.00001$), forepaw neurons ($r = 0.64$, $P = 0.0342$), and whisker neurons ($r = 0.94$, $P = 0.0006$) (Fig. 3B). The tight relationship between impulsive stimuli and ON stimuli was corroborated by the strong correlation between their response latencies (Pearson, $r = 0.98$, $P < 0.00001$). Again, this was true for hindpaw

neurons ($r = 0.94$, $P < 0.00001$), forepaw neurons ($r = 0.93$, $P = 0.00004$), and whisker neurons ($r = 0.93$, $P = 0.0009$) (Fig. 3C).

Magnitudes of response to impulsive stimuli were also weakly correlated with the magnitudes of response to OFF stimuli (Pearson, $r = 0.37$, $P = 0.0388$), which revealed a more subtle relationship between impulsive responses and OFF responses. We found that in six of six neurons that did not respond to OFF stimuli (hindpaw $n = 3$, forepaw $n = 2$, whisker $n = 1$), the magnitudes of response to impulsive stimuli were smaller than the magnitudes of response to ON stimuli (Fig. 4A), with a difference of 0.62 ± 1.16 spikes/stimulus (paired Wilcoxon, $P = 0.0313$). Conversely, in all remaining neurons, the magnitudes of response to impulsive stimuli were, on average, slightly greater than the magnitudes of response to ON stimuli (Fig. 4B), with a difference of 0.05 ± 0.20 spikes/stimulus (one-sided paired *t*-test, $P = 0.0375$). Overall, the ratio between the magnitude of response to impulsive stimuli and the magnitude of response to ON stimuli was negatively correlated with the ON–OFF tuning (Pearson, $r = -0.47$, $P = 0.0057$). This means that neurons displaying few or

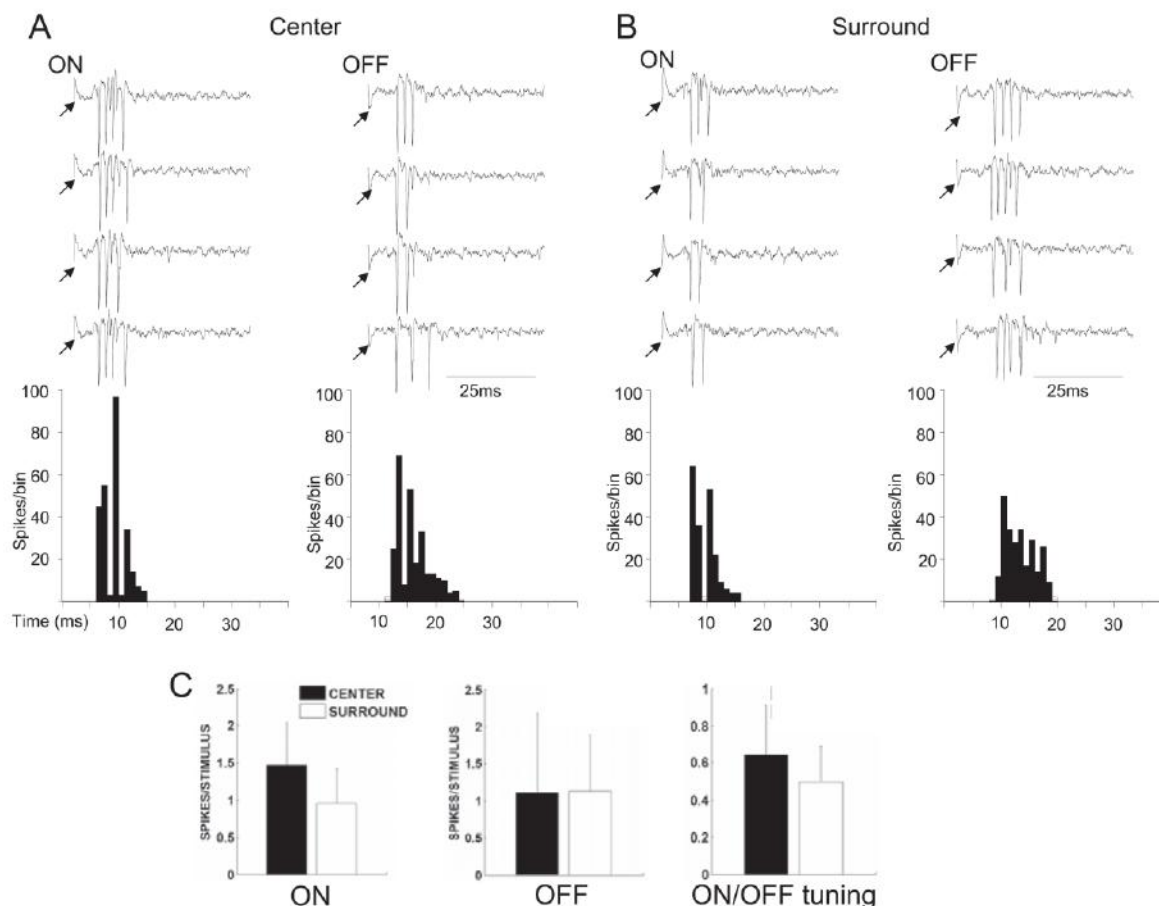


FIG. 5. Spatial structure of ON–OFF responses. (A) Representative forepaw thalamocortical neuron displaying ON responses and OFF responses in its receptive field center. (B) When the stimulus was moved to a responsive surround location, the neuron displayed smaller ON responses but larger OFF responses. The upper plots show individual traces, whereas the lower plots represent the corresponding peristimulus time histograms for 100 stimuli. (C) Column plots showing the population numbers for the ON responses (left), OFF responses (center) and the ON–OFF tuning (right). Error bars represent standard deviations.

no OFF responses (ON–OFF tuning close to 1) responded more to ON stimuli than to impulsive stimuli, whereas neurons displaying predominant OFF responses (ON–OFF tuning closer to 0) responded equally or even more to impulsive stimuli than to ON stimuli (Fig. 4).

Spatial structure of ON–OFF responses

In a subset of cells (hindpaw $n = 4$, forepaw $n = 7$, whisker $n = 1$), we recorded the responses to ON and OFF stimuli delivered to a responsive surround location (either an adjacent whisker or an adjacent digit). As expected, magnitudes of response to ON stimuli significantly and consistently decreased when the stimulus location was moved from the receptive field center to a responsive surround location (paired t -test, $P = 0.0007$). Conversely, the average magnitude of response to OFF stimuli did not significantly change when the stimulus location was moved from the receptive field center to the surround location ($P = 0.94$). Consequently, the ON–OFF tuning significantly decreased when the stimulus location was moved from the receptive field center to the surround location (one-sided paired t -test, $P = 0.0280$) (Fig. 5).

Discussion

Neurophysiological homogeneity of the ventrobasal complex

The main objective of this work was to test the neurophysiological homogeneity of the ventrobasal complex by studying the responses of thalamocortical neurons to ON, OFF and impulsive stimuli. We observed essentially the same magnitude/latency response structure for hindpaw neurons, forepaw neurons, and whisker neurons. The only exception was the expected latency gradient from whisker to forepaw to hindpaw neurons, due to the different times required to reach the brainstem from the different stimulation sites. This neurophysiological homogeneity between the VPM and VPL might seem surprising, given the striking peripheral difference between the discrete whisker pad and the continuous skin. VPM neurons, however, are specifically tuned to precise angles of whisker deflection (Waite, 1973b; Simons & Carvell, 1989), which makes the problem of defining the principal whisker of a VPM neuron and its preferred direction a continuous search problem, as complex as defining the receptive field center of a VPL neuron. The physiological equivalence between the VPM and VPL is anatomically supported by the existence of angular tuning maps in thalamic barreloids (Timofeeva *et al.*, 2003): different angles on the whisker pad correspond to different spatial coordinates within a VPM barreloid, just as different locations on the skin correspond to different spatial coordinates within a VPL cluster in the ventrobasal complex. The neurophysiological homogeneity of the ventrobasal complex validates the rat trigeminal system as a general model for tactile processing, and is important for extending the knowledge gained in VPM studies to the VPL when studying thalamocortical reorganization after peripheral lesions (Miki *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2006) or spinal cord injury (Gerke *et al.*, 2003; Hains *et al.*, 2005, 2006; Hubscher & Johnson, 2006).

Thalamocortical responses with different anesthetics: pentobarbital vs. urethane

To test the possible dependence of our results on the anesthetic used in the experiments, we performed a detailed comparison between pentobarbital and urethane anesthesia. The average spontaneous firing rate of our neurons (1.9 Hz) did not differ between pentobarbital and

urethane anesthesia, suggesting that under both anesthetics the state of the thalamocortical system in our experimental conditions was between the typical quiescent anesthetized state (0.28 Hz) (Aguilar & Castro-Alamancos, 2005) and activated states obtained by decreasing the level of anesthesia (2.9 Hz) (Aguilar & Castro-Alamancos, 2005), or active states in awake animals (2.7 Hz) (Fanselow & Nicolelis, 1999). We did find two interesting, probably related, differences between pentobarbital and urethane in the neural responses to the stimuli: (i) magnitudes of response to ON stimuli and to impulsive stimuli were greater in the pentobarbital group than in the urethane group; and (ii) the difference between the latency of OFF responses and the latency of ON responses was greater under pentobarbital anesthesia than under urethane anesthesia. These effects can probably be explained by the direct action of pentobarbital on thalamocortical neurons (Wan & Puil, 2002), possibly rendering low-threshold calcium currents easier to activate than under urethane anesthesia. All other results did not differ between pentobarbital and urethane anesthesia, suggesting that both anesthetics offer good and comparable experimental conditions for studying the spatiotemporal structure of thalamocortical responses. This is important because urethane is normally preferred in acute experiments, but only pentobarbital can be used in chronic experiments.

Comparison between responses to ON stimuli, OFF stimuli and impulsive stimuli

By comparing the responses to ON stimuli, OFF stimuli and impulsive stimuli delivered to the center of the neurons' receptive fields, we obtained the following main results.

The ON–OFF tuning displayed a gradient across neurons, so that some cells responded more to ON stimuli, and other cells responded more to OFF stimuli. It is tempting to speculate that the ON–OFF tuning could actually represent a one-dimensional projection of a bidimensional (or even tridimensional) tuning curve. In other words, thalamocortical neurons would be tuned to specific stimulus directions, thereby extending the angular tuning observed in the VPM (Waite, 1973b; Simons & Carvell, 1989; Timofeeva *et al.*, 2003; Bruno & Sakmann, 2006) to the entire ventrobasal complex. The gradient of ON–OFF tuning could also provide an effective mechanism to distribute somatosensory information across thalamocortical neurons within individual clusters (VPL) or barreloids (VPM).

On average, response magnitudes were not significantly different between ON and OFF stimuli, whereas latencies of response to OFF stimuli were longer, but by no more than few milliseconds, than those to ON stimuli. Furthermore, the spontaneous firing rate of neurons was higher immediately before OFF stimuli than immediately before ON stimuli, suggesting that with long pulses (e.g. 500 ms), neurons can reach a slightly depolarized state when recovering from the postexcitatory inhibition triggered by ON stimuli and mediated through the reticular nucleus (Pinault, 2004). This interpretation is confirmed by data from ongoing experiments in our laboratory using intracellular recordings in the ventrobasal complex under the same stimulation protocol (unpublished data). These observations are consistent with the idea that OFF responses are generated by direct synaptic input, possibly sustained by nonsynaptic mechanisms such as slow low-threshold calcium currents (Kyriazi *et al.*, 1994; Brecht & Sakmann, 2002; Minnery *et al.*, 2003).

Latencies of response to ON and OFF stimuli were highly correlated. This covariability is particularly appealing from a coding perspective, as it neurophysiologically supports the idea that latency codes based on spike-timing precision, well studied in cortex (Panzeri

386 J. Aguilar *et al.*

et al., 2001; Foffani *et al.*, 2004), can be extended from the representation of ON stimuli (Ghazanfar *et al.*, 2000) to the representation of continuously varying stimuli (Sosnik *et al.*, 2001; Montemurro *et al.*, 2007).

Responses to impulsive and ON stimuli were highly correlated, both in magnitude and latency, whereas the relationship between the responses to impulsive stimuli and those to OFF stimuli was subtler, so that impulsive responses represented a highly sublinear sum of ON responses and OFF responses. ON–OFF stimuli and impulsive stimuli therefore capture complementary aspects of the dynamic of thalamo-cortical responses to tactile stimuli.

Spatial structure

Thalamic receptive fields are remarkably large, especially during information-processing states (Nicoletis & Chapin, 1994; Rivadulla *et al.*, 2003; Aguilar & Castro-Alamancos, 2005). Our results show that the spatial structure of OFF responses does not parallel the spatial structure of ON responses; namely, OFF responses do not consistently decrease – as ON responses do – when stimuli are moved from the center of a neuron's receptive field to a responsive surround location (an adjacent whisker or an adjacent digit). This suggests that receptive fields for OFF stimuli have a different spatial shape than those for ON stimuli. From a functional perspective, the higher spatial precision of ON responses could be critical for determining exactly where a stimulus started, whereas the lower spatial precision of OFF responses could provide a distributed signal of when a stimulus ended. From a computational perspective, the different shape of receptive fields for OFF responses as compared to those for ON responses could be exploited to encode dynamic features of peripheral stimuli into spatiotemporal patterns.

Conclusion

In summary, this work offers a systematic analysis of the responses of hindpaw, forepaw and whisker thalamocortical neurons to stereotyped tactile stimuli under two different anesthetics. Our results support the view of a neurophysiologically homogeneous ventrobasal complex, in which OFF responses participate in the structure of the spatiotemporal receptive field of thalamocortical neurons for tactile stimuli.

Acknowledgements

This work was supported by Fondo de Investigación Sanitaria del Instituto de Salud Carlos III del Ministerio de Sanidad CP05/00311 (Spain), Consejería de Educación y Ciencia de la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha PAI06-0104 (Spain) and FISCAM (Spain). The authors thank Dr. Castro Rivadulla and Dr. Jorge Mariño for useful comments on the manuscript.

Abbreviations

VPL, ventral–posterior–lateral nucleus; VPM, ventral–posterior–medial nucleus.

References

- Aguilar, J.R. & Castro-Alamancos, M.A. (2005) Spatiotemporal gating of sensory inputs in thalamus during quiescent and activated states. *J. Neurosci.*, **25**, 10990–11002.
- Andersen, P., Eccles, J.C. & Sears, T.A. (1964) The ventro-basal complex of the thalamus: types of cells, their responses and their functional organization. *J. Physiol.*, **174**, 370–399.

- Armstrong-James, M. & Callahan, C.A. (1991) Thalamo-cortical processing of vibrissal information in the rat. II. Spatiotemporal convergence in the thalamic ventroposterior medial nucleus (VPM) and its relevance to generation of receptive fields of S1 cortical 'barrel' neurones. *J. Comp. Neurol.*, **303**, 211–224.
- Barbaresi, P., Spreafico, R., Frassoni, C. & Rustioni, A. (1986) GABAergic neurons are present in the dorsal column nuclei but not in the ventroposterior complex of rats. *Brain Res.*, **382**, 305–326.
- Brecht, M. & Sakmann, B. (2002) Whisker maps of neuronal subclasses of the rat ventral posterior medial thalamus, identified by whole-cell voltage recording and morphological reconstruction. *J. Physiol.*, **538**, 495–515.
- Bruno, R.M., Khatri, V., Land, P.W. & Simons, D.J. (2003) Thalamocortical angular tuning domains within individual barrels of rat somatosensory cortex. *J. Neurosci.*, **23**, 9565–9574.
- Bruno, R.M. & Sakmann, B. (2006) Cortex is driven by weak but synchronously active thalamocortical synapses. *Science*, **312**, 1622–1627.
- Canedo, A. & Aguilar, J. (2000) Spatial and cortical influences exerted on cuneothalamic and thalamocortical neurons of the cat. *Eur. J. Neurosci.*, **12**, 2515–2533.
- Castro-Alamancos, M.A. (2002) Different temporal processing of sensory inputs in the rat thalamus during quiescent and information processing states in vivo. *J. Physiol.*, **539**, 567–578.
- Castro-Alamancos, M.A. (2004) Dynamics of sensory thalamocortical synaptic networks during information processing states. *Prog. Neurobiol.*, **74**, 213–247.
- Emmers, R. (1965) Organization of the first and the second somesthetic regions (Si and Sii) in the rat thalamus. *J. Comp. Neurol.*, **124**, 215–227.
- Fanselow, E.E. & Nicolelis, M.A. (1999) Behavioral modulation of tactile responses in the rat somatosensory system. *J. Neurosci.*, **19**, 7603–7616.
- Foffani, G., Tutunculer, B. & Moxon, K.A. (2004) Role of spike timing in the forelimb somatosensory cortex of the rat. *J. Neurosci.*, **24**, 7266–7271.
- Friedberg, M.H., Lee, S.M. & Ebner, F.F. (1999) Modulation of receptive field properties of thalamic somatosensory neurons by the depth of anesthesia. *J. Neurophysiol.*, **81**, 2243–2252.
- Gerke, M.B., Duggan, A.W., Xu, L. & Siddall, P.J. (2003) Thalamic neuronal activity in rats with mechanical allodynia following contusive spinal cord injury. *Neuroscience*, **117**, 715–722.
- Ghazanfar, A.A., Stambaugh, C.R. & Nicolelis, M.A. (2000) Encoding of tactile stimulus location by somatosensory thalamocortical ensembles. *J. Neurosci.*, **20**, 3761–3775.
- Ghazanfar, A.A., Krupa, D.J. & Nicolelis, M.A. (2001) Role of cortical feedback in the receptive field structure and nonlinear response properties of somatosensory thalamic neurons. *Exp. Brain Res.*, **141**, 88–100.
- Hains, B.C., Saab, C.Y. & Waxman, S.G. (2005) Changes in electrophysiological properties and sodium channel Nav1.3 expression in thalamic neurons after spinal cord injury. *Brain*, **128**, 2359–2371.
- Hains, B.C., Saab, C.Y. & Waxman, S.G. (2006) Alterations in burst firing of thalamic VPL neurons and reversal by Na (v), 1.3 antisense after spinal cord injury. *J. Neurophysiol.*, **95**, 3343–3352.
- Harris, R.M. & Hendrickson, A.E. (1987) Local circuit neurons in the rat ventrobasal thalamus – a GABA immunocytochemical study. *Neuroscience*, **21**, 229–236.
- Higley, M.J. & Contreras, D. (2007) Frequency adaptation modulates spatial integration of sensory responses in the rat whisker system. *J. Neurophysiol.*, **97**, 3819–3824.
- Hirata, A., Aguilar, J. & Castro-Alamancos, M.A. (2006) Noradrenergic activation amplifies bottom-up and top-down signal-to-noise ratios in sensory thalamus. *J. Neurosci.*, **26**, 4426–4436.
- Houser, C.R., Vaughn, J.E., Barber, R.P. & Roberts, E. (1980) GABA neurons are the major cell type of the nucleus reticularis thalami. *Brain Res.*, **200**, 341–354.
- Hubscher, C.H. & Johnson, R.D. (2006) Chronic spinal cord injury induced changes in the responses of thalamic neurons. *Exp. Neurol.*, **197**, 177–188.
- Khatri, V., Hartings, J.A. & Simons, D.J. (2004) Adaptation in thalamic barreloid and cortical barrel neurons to periodic whisker deflections varying in frequency and velocity. *J. Neurophysiol.*, **92**, 3244–3254.
- Kyriazi, H.T., Carvell, G.E. & Simons, D.J. (1994) OFF response transformations in the whisker/barrel system. *J. Neurophysiol.*, **72**, 392–401.
- Lee, S.M., Friedberg, M.H. & Ebner, F.F. (1994) The role of GABA-mediated inhibition in the rat ventral posterior medial thalamus. I. Assessment of receptive field changes following thalamic reticular nucleus lesions. *J. Neurophysiol.*, **71**, 1702–1715.
- Li, L. & Ebner, F.F. (2007) Cortical modulation of spatial and angular tuning maps in the rat thalamus. *J. Neurosci.*, **27**, 167–179.

- Miki, K., Iwata, K., Tsuboi, Y., Morimoto, T., Kondo, E., Dai, Y., Ren, K. & Noguchi, K. (2000) Dorsal column–thalamic pathway is involved in thalamic hyperexcitability following peripheral nerve injury: a lesion study in rats with experimental mononeuropathy. *Pain*, **85**, 263–271.
- Minderhoud, J.M. (1971) An anatomical study of the efferent connections of the thalamic reticular nucleus. *Exp. Brain Res.*, **112**, 435–446.
- Minnery, B.S., Bruno, R.M. & Simons, D.J. (2003) Response transformation and receptive-field synthesis in the lemniscal trigeminothalamic circuit. *J. Neurophysiol.*, **90**, 1556–1570.
- Montemuro, M.A., Panzeri, S., Maravall, M., Alenda, A., Bale, M.R., Brambilla, M. & Petersen, R.S. (2007) Role of precise spike timing in coding of dynamic vibrissa stimuli in somatosensory thalamus. *J. Neurophysiol.*, **98**, 1871–1882.
- Nicolelis, M.A., Lin, R.C., Woodward, D.J. & Chapin, J.K. (1993) Dynamic and distributed properties of many-neuron ensembles in the ventral posterior medial thalamus of awake rats. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **90**, 2212–2216.
- Nicolelis, M.A. & Chapin, J.K. (1994) Spatiotemporal structure of somatosensory responses of many-neuron ensembles in the rat ventral posterior medial nucleus of the thalamus. *J. Neurosci.*, **14**, 3511–3532.
- Panzeri, S., Petersen, R.S., Schultz, S.R., Lebedev, M. & Diamond, M.E. (2001) The role of spike timing in the coding of stimulus location in the rat somatosensory cortex. *Neuron*, **29**, 769–777.
- Paxinos, G. & Watson, C. (1986) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, Sydney.
- Peschanski, M., Lee, C.L., Ralston, H.J. 3rd (1984) The structural organization of the ventrobasal complex of the rat as revealed by the analysis of physiologically characterized neurons injected intracellularly with horseradish peroxidase. *Brain Res.*, **297**, 63–74.
- Pinault, D. (2004) The thalamic reticular nucleus: structure, function and concept. *Brain Res. Brain Res.*, **46**, 1–31.
- Rivadulla, C., Martinez, L., Grieve, K.L. & Cudeiro, J. (2003) Receptive field structure of burst and tonic firing in feline lateral geniculate nucleus. *J. Physiol.*, **553**, 601–610.
- Saporta, S. & Kruger, L. (1977) The organization of thalamocortical relay neurons in the rat ventrobasal complex studied by the retrograde transport of horseradish peroxidase. *J. Comp. Neurol.*, **174**, 187–208.
- Scheibel, M.E. & Scheibel, A.B. (1966) The organization of the nucleus reticularis thalami: a Golgi study. *Brain Res.*, **1**, 43–62.
- Simons, D.J. & Carvell, G.E. (1989) Thalamocortical response transformation in the rat vibrissa/barrel system. *J. Neurophysiol.*, **61**, 311–330.
- Sosnik, R., Haidarliu, S. & Ahissar, E. (2001) Temporal frequency of whisker movement. I. Representations in brain stem and thalamus. *J. Neurophysiol.*, **86**, 339–353.
- Temereanca, S. & Simons, D.J. (2004) Functional topography of corticothalamic feedback enhances thalamic spatial response tuning in the somatosensory whisker/barrel system. *Neuron*, **41**, 639–651.
- Timofeeva, E., Merette, C., Emond, C., Lavalée, P. & Deschenes, M. (2003) A map of angular tuning preference in thalamic barreloids. *J. Neurosci.*, **23**, 10717–10723.
- Vahle-Hinz, C. & Gottschaldt (1983) Principal differences in the organization of the thalamic face representation in rodents and felids. In Macchi, G., Rustioni, A. & Spreafico, R. (Eds), *Somatosensory Integration in the Thalamus*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp. 125–145.
- Waite, P.M. (1973a) Somatotopic organization of vibrissal responses in the ventro-basal complex of the rat thalamus. *J. Physiol.*, **228**, 527–540.
- Waite, P.M. (1973b) The responses of cells in the rat thalamus to mechanical movements of the whiskers. *J. Physiol.*, **228**, 541–561.
- Wall, P.D. & Dubner, R. (1972) Somatosensory pathways. *Annu. Rev. Physiol.*, **34**, 315–336.
- Wan, X. & Paul, E. (2002) Pentobarbital depressant effects are independent of GABA receptors in auditory thalamic neurons. *J. Neurophysiol.*, **88**, 3067–3077.
- Welker, W.I. (1973) Principles of organization of the ventrobasal complex in mammals. *Brain Behav. Evol.*, **7**, 253–336.
- Zhao, P., Waxman, S.G. & Hains, B.C. (2006) Sodium channel expression in the ventral posterolateral nucleus of the thalamus after peripheral nerve injury. *Mol. Pain*, **2**, Art.27.

5964 • The Journal of Neuroscience, May 6, 2009 • 29(18):5964–5973

Behavioral/Systems/Cognitive

Spike Timing, Spike Count, and Temporal Information for the Discrimination of Tactile Stimuli in the Rat Ventrobasal Complex

G. Foffani,^{1,2} M. L. Morales-Botello,¹ and J. Aguilar¹¹Neurosignals Group, Hospital Nacional de Paraplégicos, Servicio de Salud de Castilla-La Mancha, Toledo 45071, Spain, and ²School of Biomedical Engineering, Science and Health Systems, Drexel University, Philadelphia, Pennsylvania 19104

The aim of this work was to investigate the role of spike timing for the discrimination of tactile stimuli in the thalamic ventrobasal complex of the rat. We applied information-theoretic measures and computational experiments on neurophysiological data to test the ability of single-neuron responses to discriminate stimulus location and stimulus dynamics using either spike count (40 ms bin size) or spike timing (1 ms bin size). Our main finding is not only that spike timing provides additional information over spike count alone, but specifically that the temporal aspects of the code can be more informative than spike count in the rat ventrobasal complex. Virtually all temporal information—i.e., information exclusively related to when the spikes occur—is conveyed by first spikes, arising mostly from latency differences between the responses to different stimuli. Although the imprecision of first spikes (i.e., the jitter) is highly detrimental for the information conveyed by latency differences, jitter differences can contribute to temporal information, but only if latency differences are close to zero. We conclude that temporal information conveyed by spike timing can be higher than spike count information for the discrimination of somatosensory stimuli in the rat ventrobasal complex.

Introduction

Understanding the neural code is a major challenge for system neuroscientists. To attempt a definition, the neural code is “a system of signals or symbols for communication”—which is the Merriam-Webster’s lemma for “code”—applied to the nervous system. The field of neural coding relies on two main assumptions: information is carried by neurons, and neural “symbols” are made of spikes. The fundamental problem of neural coding is therefore to understand how spikes construct the symbols that neurons use to communicate information.

Spikes are stereotyped events precisely defined in time. The simplest way to construct symbols with such events is to use spike count, i.e., to count the number of spikes occurring in a given time window (Adrian, 1928). Using spike count, a neuron can only construct as many symbols as the number of spikes it is able to fire within the time window. A potentially more powerful way to construct symbols with spikes is to use spike timing, i.e., to consider exactly when spikes occur within the time window (Opticam and Richmond, 1987; Bialek et al., 1991; Hopfield, 1995; deCharms and Merzenich, 1996; Victor and Purpura, 1996; de Ruyter van Steveninck et al., 1997; Borst and Theunissen, 1999;

Reich et al., 2001; Chase and Young, 2006; Butts et al., 2007). The maximum number of symbols a neuron can construct with spike timing is limited only by the temporal resolution of the code (MacKay and McCulloch, 1952). In formal terms, the information capacity of spike timing is much higher than the information capacity of spike count.

The rat trigeminal system offered an attractive model that contributed to uncover the role of spike timing in the neural code. Two main problems have been investigated: (1) discrimination of stimulus location, when the same stimulus was delivered to different whiskers; (2) discrimination of stimulus dynamics, when stimuli with different dynamical content were delivered to the same whisker. In the whisker cortex, spike timing was consistently shown to convey more information than spike count alone (Ghazanfar et al., 2000; Panzeri et al., 2001; Foffani and Moxon, 2004; Arabzadeh et al., 2006). This importance of spike timing was extended to the forepaw cortex, suggesting a more general principle of sensory processing (Foffani et al., 2004, 2008; Blanc and Coq, 2007).

All tactile information reaching the cortex, however, has to pass through the thalamus. Consistently with the high temporal precision of thalamic responses to whisker stimuli (Nicoletis and Chapin, 1994; Deschênes et al., 2003; Aguilar and Castro-Alamancos, 2005), spike timing is more informative than spike count alone in the trigeminal thalamus (Ghazanfar et al., 2000; Montemurro et al., 2007). We have previously shown that thalamic neurons of the ventroposteromedial nucleus (VPM), which represents the whiskers, and of the ventroposterolateral nucleus (VPL), which represents the rest of the body, exhibit essentially the same magnitude/latency structure in their responses to ste-

Received Sept. 15, 2008; revised March 28, 2009; accepted April 5, 2009.

This work was supported by Fondo de Investigación Sanitaria del Instituto de Salud Carlos III del Ministerio de Sanidad (P05/00311 P05/2322 (Spain), Consejería de Educación y Ciencia de la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha PAI06-0104 (Spain), and Fundación para la Investigación Sanitaria en Castilla-La Mancha (Spain). We thank Dr. Casto Rivadulla for useful comments on this manuscript.

Correspondence should be addressed to G. Foffani, Finca La Peralada s/n, 45071 Toledo, Spain. E-mail: gfoffani@fundacionhnp.org or guglielmo.foffani@drexel.edu.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.4416-08.2009

Copyright © 2009 Society for Neuroscience 0270-6474/09/295964-10\$15.00/0

reotyped tactile stimuli (Aguilar et al., 2008). Here, we apply information-theoretic measures and computational experiments on the same data, investigating the nature of spike timing information in the entire ventrobasal complex.

Materials and Methods

Experimental procedures. Experimental data have been previously published (Aguilar et al., 2008). Data were obtained from 13 male rats (250–350 g) anesthetized at stage III-3 (Friedberg et al., 1999). The level of anesthesia was monitored by electrocorticogram recording from the primary somatosensory cortex and by tail-pinch reflex. The experiments were performed under a predominant frequency of 3–4 Hz in the electrocorticogram recording, which represents a less synchronized state compared with the deeper anesthesia levels characterized by rhythmic bursts at lower frequencies. If rhythmic bursts were detected during the experimental protocol, the stimulation protocol was aborted. The level of anesthesia was kept constant at stage III-3 throughout the course of the experiments by applying supplemental doses when required (1/4 of original doses). Stage III-3 was chosen because it allows consistent single-neuron recordings to be performed through long stimulation protocols, and it retains at least part of the spatiotemporal complexity that characterizes the responses of thalamocortical neurons in active states (Aguilar and Castro-Alamancos, 2005).

Thalamic extracellular single-unit recordings were obtained from VPM and VPL (anteroposterior, -2.3 to -4.0 ; lateral, 2 – 4 ; dorsal, 5 – 7) using tungsten electrodes with $4\text{M}\Omega$ impedance (at 1 kHz). We studied the responses to whisker stimulation for VPM neurons and the responses to cutaneous stimulation in forepaw or hindpaw for VPL neurons. Once a neuron was isolated, we located the receptive field center, defined as the whisker or cutaneous area that consistently elicited the response with greater magnitude (number of spikes/stimulus) and shorter latency ($n = 39$ neurons). In a subset of VPL cells ($n = 11$ neurons), we located not only the center of their receptive field (e.g., one digit) but also a responsive surround location (e.g., an adjacent digit).

We then applied our ON–OFF tactile stimulation protocol, which consisted of a set of 100 square-pulse stimuli of 0.5 Hz frequency and 500 ms duration. All stimuli were generated using a Master8 electrical stimulator (A.M.P.I.) with an ISO-Flex stimulus isolator (A.M.P.I.). Electrical pulses were delivered to a custom-made piezoelectric sensor attached to a rigid tungsten bar (0.5 mm in diameter, 2.5 cm long, with the tip curved at 90° for 5 mm). The piezoelectric sensor transduces electrical pulses into mechanical movements, whose range depends on the voltage. We used a voltage of 90 V , which imposed a final vertical movement of 0.5 mm to the tungsten bar. The tungsten bar was situated manually under microscopic control (Leica M300; Leica Microsystems) just a few micrometers over, but never touching, the whisker or the cutaneous area selected previously. The output of the Master8 stimulator was sent to the CED Power 1401 and recorded in Spike2 together with the signals to trigger the subsequent data analysis.

Neurons were meticulously discriminated off-line using filtering, voltage threshold methods and spike-sorting protocols in a complementary way. For the purpose of the present study, we considered two datasets: (1) the reduced dataset of 11 VPL neurons stimulated both in the center of their receptive field and in the responsive surround location; (2) the full dataset of 39 neurons stimulated only in the center of their receptive field.

Data analysis. Our basic problem was to quantify how much information can be extracted about the discrimination of stimulus location and the discrimination of stimulus dynamics from the single-trial responses of individual thalamic neurons, using either spike count or spike timing. As a model of discrimination of stimulus location, we considered the problem of discriminating between center and surround stimuli. As a model of discrimination of stimulus dynamics, we considered the problem of discriminating between ON and OFF stimuli delivered to the same location. The main difference between the discrimination of ON versus OFF stimuli compared with the discrimination of stimulus location is the following: independently of whether the dynamical difference of ON versus OFF stimuli (i.e., opposite movement direction of the stimulator) activates different peripheral receptors, ON and OFF stimuli remain con-

fined within a single cutaneous area (or whisker) somatotopically corresponding to the same thalamic cluster (or barreloid); conversely in the discrimination of stimulus location, stimuli delivered to different fingers (or whiskers) somatotopically correspond to different thalamic clusters (or barreloids). Nonetheless, the basic coding principles under investigation are the same for the discrimination of stimulus location and for the discrimination of ON vs OFF stimuli.

By “information,” here and throughout the study we specifically refer to Shannon’s mutual information between the single-neuron responses and the stimuli. To discriminate two stimuli is a binary problem, so the maximum information, i.e., the entropy of the stimuli, is 1 bit. To say that a neuron conveys 1 bit of information means that from any single-trial response we can infer with full certainty which of the two stimuli generated that response. Indeed, spike timing information is more likely to emerge when the full information capacity of spike timing can be exploited, which happens in the discrimination between a high number of stimuli. The fact that we used binary discrimination problems is thus conservative for our purposes. To corroborate that our main results are not specific for binary discrimination, in neurons stimulated both in the center of their receptive field and in the responsive surround location we also performed the discrimination between all four stimuli available (ON center, ON surround, OFF center, OFF surround). In this case, the entropy of the stimuli is 2 bits.

Spike count information. To extract spike count information, for each neuron we considered a 40-ms -long poststimulus time window, counted the number of spikes the neuron emitted in each single trial, estimated the conditional probabilities of the responses given the stimuli, and directly calculated the mutual information between responses and stimuli as follows:

$$I(r, s) = \sum_s \sum_r P(s) P(r|s) \log_2 \left(\frac{P(r|s)}{P(r)} \right), \quad (1)$$

where $P(s)$ is the prior probability of occurrence of the stimulus s , which was always 0.5 for both stimuli because the number trials per stimulus was the same (100), $P(r|s)$ is the conditional probability of the response r to occur given the stimulus s , and $P(r)$ is the probability of the response r to occur given any stimulus. Because the responses of our neurons almost never exceeded 4 spikes in any given trial, the upward bias of the mutual information attributable to finite sampling was experimentally minimized by using 20 times as many trials per stimulus (100) as the number of possible responses (five).

Spike timing information. To extract spike timing information, we divided the poststimulus time window into 40 bins of 1 ms and registered the presence or absence of a spike in each bin as 1 or 0. With 40 1 ms bins, a neural response to a stimulus looks something like this: 0000000100010000000000000000000000000000.

The above response represents a neuron that fires two spikes, the first one 8 ms after the stimulus and the second one 12 ms after the stimulus. To calculate the mutual information with these types of responses is somewhat problematic, because the number of possible responses is too high for their probabilities to be precisely estimated from the finite number of trials experimentally available (in our case 100), which produces upward bias in the mutual information measure (Panzeri et al., 2007; Nemenman et al., 2008). To avoid this problem, we reduced the dimensionality of the responses by using them to classify the stimuli. To this end, we used the peristimulus time histogram (PSTH)-based classification method (Foffani and Moxon, 2004), which consists of creating a set of templates based on the average neural responses to the stimuli delivered (i.e., PSTHs), and classifying each single-trial response by assigning it to the stimulus with the “closest” template in Euclidean distance sense. The outcome of the classification is then used to calculate the mutual information between the predicted stimuli σ and the real stimuli s , as follows:

$$I(\sigma, s) = \sum_s \sum_\sigma P(s) P(\sigma|s) \log_2 \left(\frac{P(\sigma|s)}{P(\sigma)} \right), \quad (2)$$

where $P(s)$ is again the probability of occurrence of the stimulus s (i.e., 0.5 for both stimuli in our case), $P(\sigma|s)$ is the probability of predicting stim-

ulus σ when stimulus s was delivered, and $P(\sigma)$ is the probability of predicting stimulus σ independently of what stimulus was actually delivered. The way by which the conditional probabilities $P(\sigma|s)$ are estimated using the PSTH-based classifier can be formalized as follows:

$$P(\sigma = 1 | s = j) = \frac{1}{N} \sum_{t \in j} (\min[X(s', t)] \equiv \hat{t})$$

$$X(s', t) = \begin{cases} \sum_b (r_b(t) - \bar{r}_b(s'))^2 & s' \neq j \\ \sum_b \left(r_b(t) - \left(\bar{r}_b(s') - \frac{r_b(t)}{N} \right) \frac{N}{N-1} \right)^2 & s' = j \end{cases} \quad (3)$$

where N is the number of trials per stimulus ($N = 100$), $t \in j$ indicates the trials corresponding to stimulus $s = j$, the minimum is calculated across all stimuli s' (in our case two), $r_b(t)$ represents the single-trial response in bin b ($b = 1:40$) of trial t , and $\bar{r}_b(s')$ is the PSTH value of bin b corresponding to stimulus s' (i.e., the template), calculated as follows:

$$\bar{r}_b(s' = k) = \frac{1}{N} \sum_{t \in k} r_b(t). \quad (4)$$

Importantly, when the single-trial response $r_b(t)$ corresponding to stimulus j is compared against the PSTH $\bar{r}_b(s')$ corresponding to the same stimulus $s' = j$, the single-trial response is subtracted from the PSTH in the calculation of the Euclidean distance $X(s', t)$ to guarantee complete cross-validation in the classification (Foffani and Moxon, 2004). The upward bias of the mutual information, because of finite sampling, was experimentally minimized by using 50 times as many trials per stimulus as the number of possible stimuli (two). The mutual information $I(\sigma, s)$ between predicted stimuli and real stimuli represents a rigorous lower bound of the mutual information between the binned neural responses and the stimuli (Kjaer et al., 1994; Rolls et al., 1997; Furukawa and Middlebrooks, 2002; Schneidman et al., 2003). We thus used this conservative measure to extract spike timing information in our data.

Spike timing information, spike count information, and temporal information. The concept of spike timing implicitly considers both how many spikes occurred and when they occurred. Intuitively, there is no timing if there is no spike. This concept of spike timing is not related to the particular method we used to estimate spike timing information (the PSTH-based classification method), but is intrinsic in the way the responses are considered to construct the symbols of the code (i.e., binning at 1 ms bin size). This is consistent with previous studies applying information measures in the rat somatosensory system (Panzeri et al., 2001; Petersen et al., 2001; Foffani et al., 2004; Arabzadeh et al., 2006; Montemurro et al., 2007; Foffani et al., 2008).

In the present work, we explicitly considered that spike timing information includes both spike count information (how many spikes occurred) and temporal information (when they occurred). In general, temporal information and spike count information are not independent. Defining ΔI as the synergy/redundancy between temporal information I_{temporal} and spike count information $I_{\text{spike-count}}$, we can write the following intuitive relation (Nelken et al., 2005): $I_{\text{spike-timing}} = I_{\text{spike-count}} + I_{\text{temporal}} + \Delta I$.

The synergy/redundancy term ΔI is zero not only when spike count information and spike timing information are independent, but also when spike count information is zero. In these cases all spike timing information is temporal information.

To reach the conclusion that temporal information alone is greater than spike count information, we thus performed two analyses. (1) The first analysis consisted of considering only the first spike in each single-trial response and only responsive trials (i.e., trials with spikes) (Nelken et al., 2005). In this condition, spike count information is identically zero, so all spike timing information estimated with the PSTH-based classification method is indeed temporal information. (2) The second analysis consisted of selecting neurons that exhibited similar response magnitudes to the stimuli. In these neurons, spike count information should be close to zero, so the difference between spike timing information and spike count information will represent a tight lower bound of the tem-

poral information, i.e., most spike timing information will indeed be temporal information.

Simulations with latencies and jitters. To further investigate the basic elements of the temporal code, we performed a set of computational experiments. Using the physiological data as the starting point, the simulations allowed us to explore a larger range of response parameters than that available in the physiological variability. We modulated three main parameters of the responses: (1) the latency difference between stimuli, (2) the overall jitter of the responses, and (3) the jitter difference between stimuli. All three parameters represent the fundamental properties of the simulated responses, and the information obtained with these simulations will allow us to bring the results to a more general level.

To modulate the latency difference, for each neuron we first aligned the responses to the two stimuli so that the latency difference was 0 ms. We then moved the responses to one stimulus respect to the other, to impose a determined latency difference. This operation was repeated with increasing latency difference (0.2 ms steps). For each latency difference, we calculated the spike timing information that could be extracted about the discrimination between the two stimuli.

To modulate the overall jitter, defined as the SD of the first-spike latency averaged across the two stimuli, we added Gaussian noise to each single-trial first-spike latency, resulting in an increased overall jitter of the neural responses. This operation was repeated with increasing variance of the Gaussian noise (1 ms steps), resulting in an increasing overall jitter. For each jitter value, we calculated the spike timing information that could be extracted about the discrimination between the two stimuli. Importantly, adding jitter to the neural responses is formally equivalent to adding jitter to the temporal reference used to trigger the responses, which can be interpreted in terms of imprecision of a decoder. Our results will thus also provide basic requirements for a decoder to be able to extract temporal information from the neural responses.

To modulate the jitter difference, we added Gaussian noise to the single-trial first-spike latencies, only in correspondence to the stimulus with smaller jitter to reach a situation in which the jitter difference was approximately zero. We then increased the variance of the Gaussian noise (5 ms steps), resulting in an increasing jitter difference between the stimuli. For each jitter difference, we calculated the spike timing information that could be extracted about the discrimination between the two stimuli.

The simulations described above were also combined to investigate the joint contribution of latency differences, overall jitter and jitter differences to the temporal information.

Throughout the text values are given as mean \pm SD. Statistical comparisons were performed with paired t tests or repeated-measures ANOVA. Results were considered significant at $p < 0.05$. All the analyses were performed in Matlab (version 7.1, The Mathworks).

Results

Spike timing information in VPL

We analyzed a dataset of 11 well discriminated VPL neurons responding to ON and OFF tactile stimuli delivered to two different locations: the center of their excitatory receptive field (e.g., one digit) and a responsive surround location (e.g., an adjacent digit). As a model of discrimination of stimulus location, we used the ON responses to discriminate between center and surround stimuli (Fig. 1*A,D*). Using spike count we could extract 0.18 ± 0.13 bits of information. Using spike timing we could extract 0.37 ± 0.30 bits of information, that is 106% more information than spike count. As a model of discrimination of stimulus dynamics we discriminated between ON and OFF stimuli delivered at the center location (Fig. 1*B,E*). Using spike count we could extract 0.38 ± 0.27 bits of information. Using spike timing we could extract 0.65 ± 0.18 bits of information, that is 71% more information than spike count. We also discriminated between ON and OFF stimuli delivered at the surround location (Fig. 1*C,F*). Using spike count we could extract 0.14 ± 0.13 bits of information. Using spike timing we could extract 0.31 ± 0.23 bits

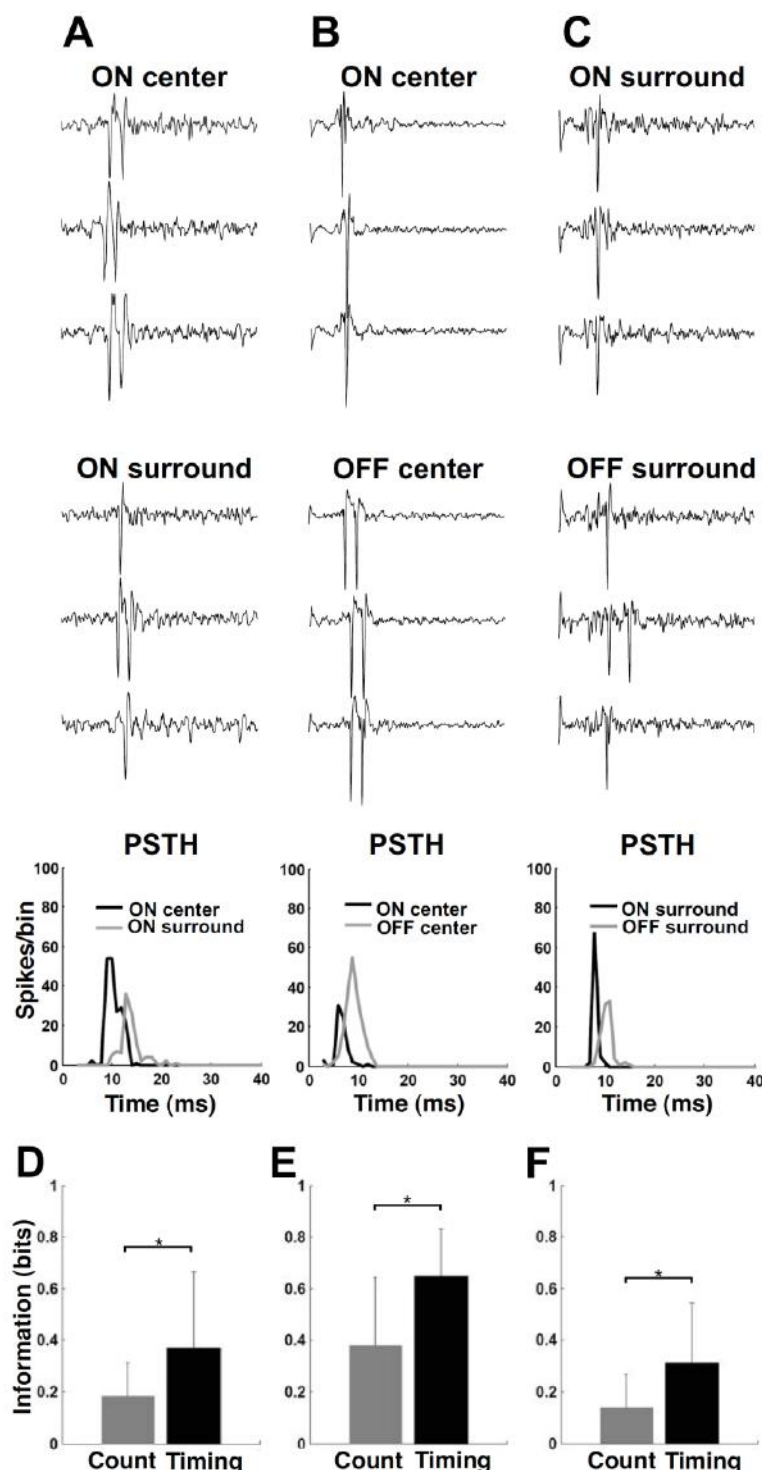


Figure 1. Spike timing information in VPL. **A**, Discrimination of stimulus location. Representative neuron responding to ON stimuli delivered to its receptive field center (top three traces) and to a responsive surround location (middle three traces), with the corresponding PSTHs (bottom, calculated over all 100 responses/stimulus available). **B**, **C**, Discrimination of stimulus dynamics. Representative neurons responding to ON and OFF stimuli delivered (**B**) to the receptive field center, or (**C**) to a responsive

of information, that is 121% more information than spike count. Two-way repeated-measures ANOVA confirmed that spike timing information was significantly greater than spike count information in the three discrimination problems described above (first factor, spike count vs spike timing: $p = 0.0055$; second factor, the discrimination problem: $p = 0.0006$, interaction $p = 0.38$). Finally, we discriminated between all four stimuli: ON stimuli delivered to the center, ON stimuli delivered to the surround, OFF stimuli delivered to the center, OFF stimuli delivered to the surround. Using spike count we could extract 0.34 ± 0.20 bits of information. Using spike timing we could extract 0.78 ± 0.29 bits of information, that is 129% more information than spike count (paired t test: $p = 0.0017$).

Spike timing information, spike count information, and temporal information

The binned neural responses used to investigate the role of spike timing quantify both how many spikes occurred (spike count information) and when they occurred (temporal information). Let us consider two representative neurons (Fig. 2). One neuron responded to the two stimuli with different magnitudes and different latencies (Fig. 2A). The other neuron responded to the two stimuli with similar magnitudes and different latencies (Fig. 2B). In the first neuron, in which the response magnitudes to the two stimuli were different (1.4 vs 3.1 spikes/stimulus), spike timing did not provide additional information beyond spike count in our estimate, although the latency difference could clearly discriminate between the two stimuli. In this case, the information extracted with spike timing does not offer any insight about the temporal information obviously conveyed by latency difference and thus does not disambiguate it from spike count information. Conversely, in the second neuron, in which the response magnitudes to the two stimuli were similar (1.1 vs 1.3 spikes/stimulus), spike timing provided ~ 10 times more information than spike count. In this case, virtually all the information extracted with spike timing was temporal information conveyed by latency differences. In gen-

surround location. Top-to-bottom as in **A**. **D–F**, Spike count information (gray) and spike timing information (black) extracted about the discrimination of (**D**) stimulus location and (**E**, **F**) stimulus dynamics. Bars represent average values of all neurons ($n = 11$). Error bars represent SDs. Asterisks indicate significant differences ($p < 0.05$).

eral, to say that using spike timing we could extract more information than spike count means that in the neural responses there was some temporal information that was independent of spike count information, but it does not necessarily mean that temporal information alone was greater than spike count information.

To test whether in our experimental data temporal information alone was greater than spike count information, we performed two analyses. The first idea was to consider only the first spike in each single-trial response and only responsive trials (i.e., trials with spikes). In this condition there is no spike count information, so all spike timing information is indeed temporal information. We thus investigated the information conveyed by the first spikes of responsive trials in the same dataset of 11 neurons responding to ON and OFF stimuli delivered to the center of their receptive field and to a responsive surround location. Again, we first used the ON responses to discriminate between center and surround stimuli. Using spike count with all spikes of responsive trials we could extract 0.12 ± 0.11 bits of information. Using spike timing with only first spikes of responsive trials we could extract 0.26 ± 0.24 bits of information. Temporal information alone on average was thus at least 116% greater than spike count information. We then discriminated between ON stimuli and OFF stimuli delivered at the center location. Using spike count with all spikes of responsive trials we could extract 0.20 ± 0.16 bits of information. Using spike timing with only first spikes of responsive trials we could extract 0.53 ± 0.27 bits of information. Temporal information alone on average was thus at least 165% greater than spike count information. We finally discriminated between ON stimuli and OFF stimuli delivered at the surround location. Using spike count with all spikes of responsive trials we could extract 0.09 ± 0.10 bits of information. Using spike timing with only first spikes of responsive trials we could extract 0.40 ± 0.29 bits of information. Temporal information alone was thus on average at least 344% greater than spike count information. Two-way repeated-measures ANOVA confirmed that in responsive trials temporal information was significantly greater than spike count information in the three discrimination problems described above (first factor, spike count vs temporal: $p = 0.0028$; second factor, the discrimination problem: $p = 0.0136$; interaction $p = 0.24$).

The second idea was to select neurons exhibiting similar response magnitudes to the stimuli. In this condition, spike count information is expected to be very small, so that most spike timing information can be unambiguously considered temporal information. We investigated this idea in a dataset of 39 thalamo-

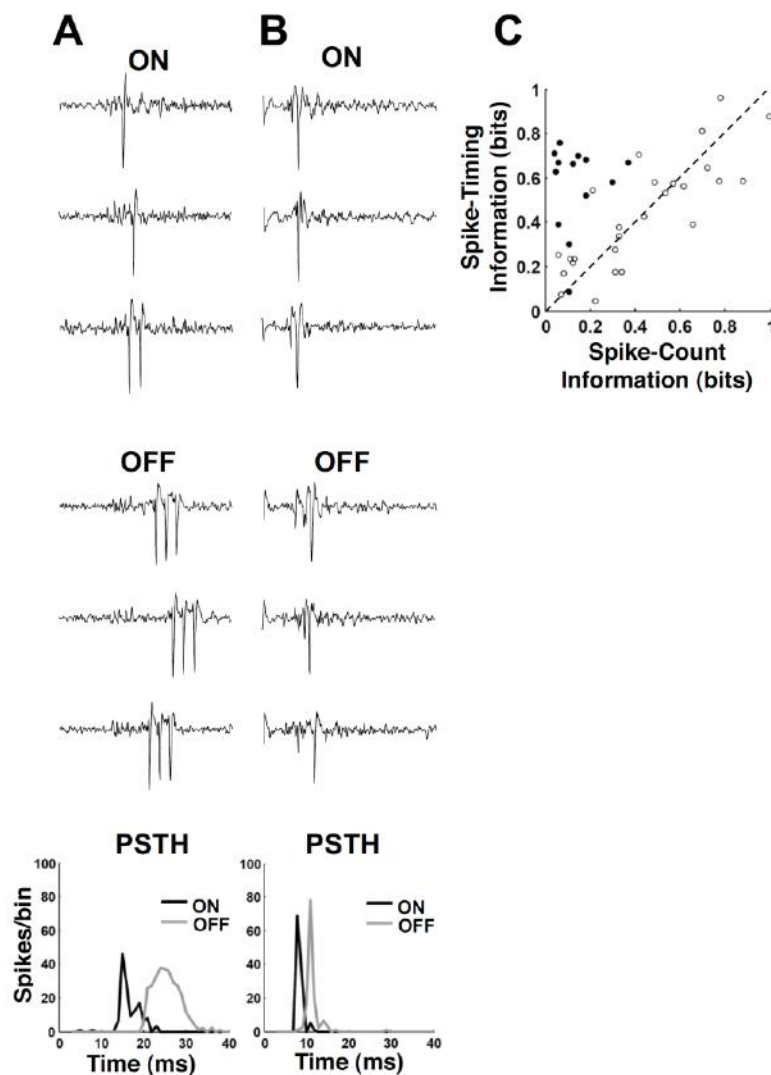


Figure 2. Spike timing information, spike count information, and temporal information. *A, B*, Representative neurons responding to ON and OFF stimuli (*A*) with different response magnitudes and (*B*) with similar response magnitudes. Top-to-bottom as in Figure 1 *A–C*. *C*, Scatter plot of spike count information and spike timing information for all 39 neurons responding ON and OFF stimuli delivered to the center of their receptive field. Empty symbols represent neurons exhibiting high magnitude difference between the responses to the two stimuli ($n = 26$); filled symbols represent neurons exhibiting low magnitude difference ($n = 13$). In most neurons exhibiting high magnitude difference it is not possible to disambiguate temporal information from spike-count information. In most neurons exhibiting low magnitude difference, most spike timing information can be unambiguously considered temporal information.

cortical neurons responding to ON and OFF stimuli delivered to the center of their receptive field. We sorted our 39 neurons into two groups: one group was composed by two-thirds of neurons exhibiting high magnitude difference between the responses to the two stimuli (1.1 ± 0.9 spikes/stimulus, $n = 26$), like the neuron in Figure 2*A*; the other group was composed by the remaining one-third of neurons exhibiting small magnitude difference (0.4 ± 0.3 spikes/stimulus, $n = 13$), like the neuron in Figure 2*B* (Table 1). We found that neurons that responded to the two stimuli with different magnitudes conveyed similar information with spike count (0.43 ± 0.27 bits) or spike timing (0.44 ± 0.25

Table 1. Neurophysiological properties of neurons responding to ON and OFF stimuli

| | Neurons exhibiting high magnitude difference (<i>n</i> = 26) | | Neurons exhibiting low magnitude difference (<i>n</i> = 13) | |
|--------------------------------------|---|-------------------------|--|-------------------------|
| | ON (range) | OFF (range) | ON (range) | OFF (range) |
| Response magnitude (spikes/stimulus) | 1.49 ± 0.89 (0.32–4.79) | 1.07 ± 1.11 (0.00–3.37) | 1.60 ± 0.51 (0.90–2.64) | 1.27 ± 0.59 (0.64–2.65) |
| Prestimulus activity (Hz) | 2.2 ± 3.4 | 4.7 ± 4.9 | 1.0 ± 1.6 | 1.2 ± 1.3 |
| % of first spikes | 67 ± 21 | 50 ± 28 | 65 ± 21 | 70 ± 21 |
| Latency of first spikes (ms) | 10.3 ± 3.5 | 14.6 ± 6.0 | 9.2 ± 2.6 | 13.3 ± 4.7 |
| Jitter of first spikes (ms) | 1.7 ± 1.2 | 4.3 ± 3.7 | 1.0 ± 0.8 | 2.4 ± 1.4 |

The response magnitude was calculated as the average number of spikes per stimulus in the same 40 ms poststimulus time window used in the information analyses. The prestimulus activity was calculated in a 40 ms prestimulus time window and expressed in hertz. The % of first spikes was calculated as the percentage of spikes that are first spikes of the single-trial responses. Latencies and jitters of first spikes are also included.

bits, paired *t* test: *p* = 0.4514). In some neurons spike timing did provide some additional information over spike count, but in other neurons the estimated spike timing information was actually lower than spike count information because of underestimation (Fig. 2C). Overall, in this group it was not possible to disambiguate temporal information from spike count information. Conversely, neurons that responded to the two stimuli with similar magnitudes conveyed remarkably more information with spike timing (0.57 ± 0.20 bits) compared with spike count (0.14 ± 0.10 bits, paired *t* test: *p* = 0.000004). In this group the additional information conveyed by spike timing compared with spike count, which represents a conservative estimate of the temporal information, was 207% greater than the information conveyed by spike count.

To corroborate the relation between temporal information and first spikes, in the same dataset of 39 neurons responding to ON and OFF stimuli delivered to the center of their receptive field, we investigated the spike timing information conveyed by the first spike in each single-trial response. In the 26 neurons that responded to the two stimuli with different magnitudes the first spike conveyed 0.38 ± 0.24 bits, which corresponds to 86% of the information conveyed by all spikes. In the 13 neurons that responded to the two stimuli with similar magnitudes the first spike conveyed 0.55 ± 0.18 bits, which corresponds to 97% of the information conveyed by all spikes. In these 13 neurons, first spikes represented 65% of spikes in the ON responses and 70% of spikes in the OFF responses, which means that the remaining 35% and 30% of spikes provided little information that was not already conveyed by first spikes. When spike count is ambiguous, therefore, first spikes convey virtually all temporal information.

Taken as a whole, these results suggest that temporal information alone can be greater than spike count information, and support the idea of first spikes representing the basis of temporal information in the rat ventrobasal complex.

Informational contribution of first-spike latencies and jitters

To further investigate the nature of temporal information, we performed a set of computational experiments on the 13 neurons that responded with similar magnitudes to ON and OFF stimuli delivered to the center of their receptive field, using the first spikes of the single-trial responses. Because first spikes can be effectively characterized in terms of latencies and jitters, we modulated three main parameters of the responses: (1) the latency difference between stimuli (Fig. 3A), (2) the overall jitter of the responses (Fig. 3B), and (3) the jitter difference between stimuli (Fig. 3C). The rationale of these simulations is that they allowed us to explore a larger range of response parameters than that available in the physiological variability.

The first intuitive idea we tested is that temporal information arises from latency differences between the responses to different stimuli. As expected, information increased as the latency differ-

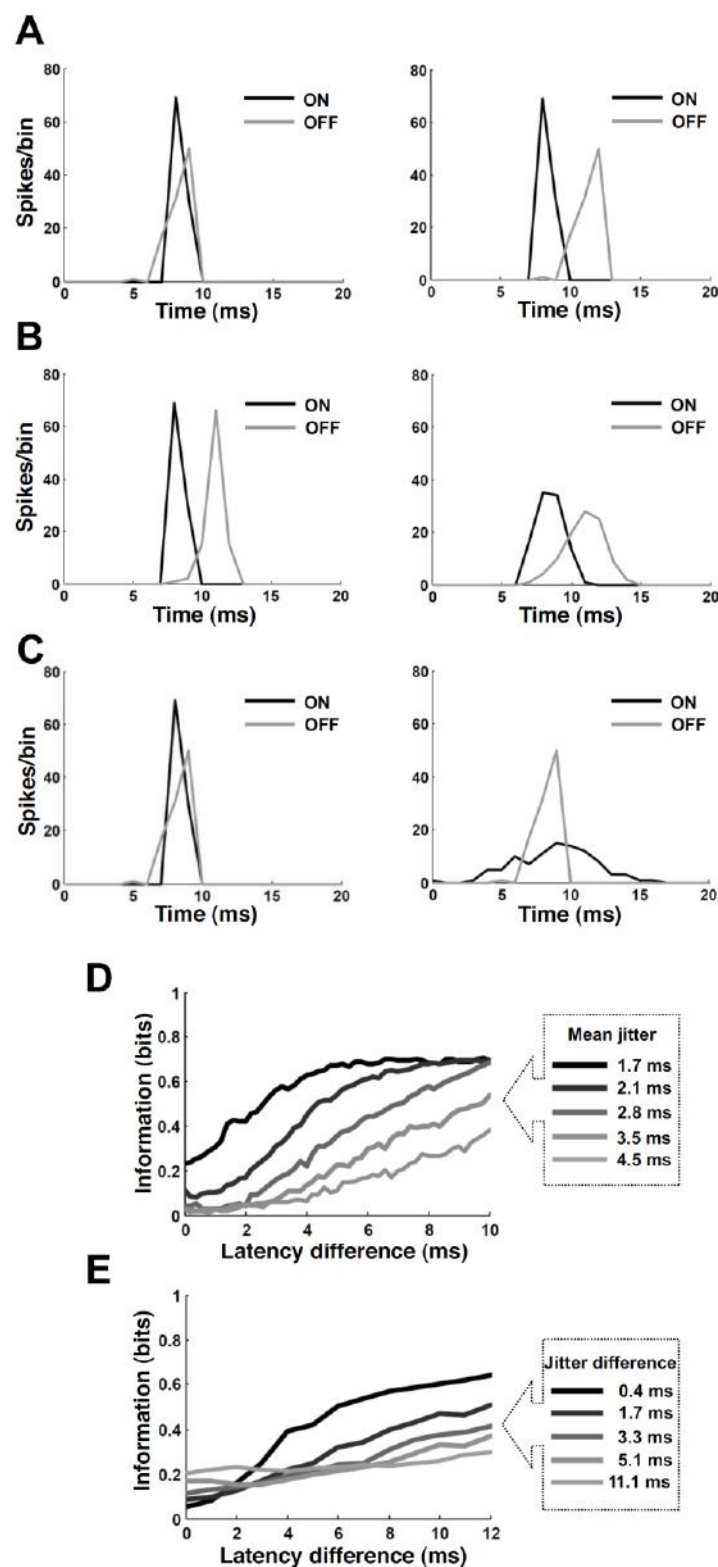
ence was increased, rapidly reaching a saturation point of 0.70 ± 0.18 bits. With physiological jitters, the latency difference that allowed the responses to convey 50% of the maximal information was 1.9 ± 0.9 ms, and the latency difference that allowed the responses to convey 95% of the maximal information was 3.8 ± 1.4 ms.

The second intuitive idea we tested is that the jitters of the neural responses limit the temporal information conveyed by latency differences. We observed that increasing the jitter of the neural responses rapidly reduced the information that could be extracted, from 0.55 ± 0.18 bits with the physiologic jitter of 1.7 ± 1.0 ms, to 0.10 ± 0.12 bits with an overall jitter of 4.4 ± 0.5 ms. Similarly, when the jitter was increased, the latency difference that allowed the responses to convey 50% of the maximal information increased from 1.9 ± 0.9 ms to 9.1 ± 1.8 ms, and the latency difference that allowed the responses to convey 95% of the maximal information increased from 3.8 ± 1.4 ms to 16.6 ± 3.2 ms. More in general, the latency difference that was necessary to allow neurons to transmit a given amount of information increased as the jitter of the neural responses was increased (Fig. 3D). If adding jitter to the neural responses is interpreted from a decoding perspective, these results also quantify how the temporal imprecision of a decoder can affect its ability to extract information conveyed by latency differences.

Latency differences are not the only possible source of temporal information. The third intuitive idea we tested is that at least some information unrelated to latency differences could be attributable to jitter differences between responses to different stimuli. This idea has physiological relevance in our dataset, as the jitter of the responses to ON stimuli (1.0 ± 0.8 ms) was significantly smaller than the jitter of the responses to OFF stimuli (2.4 ± 1.4 ms; paired *t* test: *p* = 0.0004, *n* = 13). For each neuron we first aligned the responses so that the latency difference was zero and therefore could not contribute any information. As expected, the information increased as the jitter difference was increased, reaching a saturation point much lower than what we observed by increasing latency differences. With a jitter difference of 12.8 ± 4.3 ms we obtained 0.26 ± 0.16 bits of information. We then investigated how the informational contribution of jitter differences changed as a function of the latency difference. We found that increasing the jitter differences increased the information only if the latency differences were very close to zero, whereas it always decreased the information if latency differences were sufficiently large (Fig. 3E).

Discussion

The main finding of the present work is not only that spike timing provides additional information over spike count alone, but specifically that the temporal aspects of the code can be more informative than spike count in the rat ventrobasal complex. Virtually all temporal information—i.e., information exclusively related to



when the spikes occur—is conveyed by first spikes, arising mostly from latency differences between the responses to different stimuli. Although jitters are highly detrimental for the information conveyed by latency differences, jitter differences between stimuli can contribute to temporal information, but only if latency differences are close to zero.

Methodological considerations

Mutual information was used as a rigorous measure of statistical predictability between stimuli and neural responses. To estimate mutual information, we directly used Shannon's formula for spike count, whereas we resorted to PSTH-based classification for spike timing to avoid overestimating the information because of the bias problem. PSTH-based classification (Foffani and Moxon, 2004) has now been used in a number of studies (Foffani et al., 2004, 2008; Gutierrez et al., 2006; Malone et al., 2007; Engineer et al., 2008). Because PSTH-based classification provides a lower bound of spike timing information and has better sampling properties compared with the direct Shannon's formula, the additional information conveyed by spike timing over spike count in our data is a conservative estimate. PSTH-based classification does not explicitly take into account information represented by spike patterns, i.e., correlations between spikes in different bins. However, correlations between spikes seem to play a minor role for information encoding and decoding in the rat thalamus (Montemurro et al., 2007). Furthermore, first spikes conveyed virtually all information in our data, sug-

Figure 3. Informational contribution of first-spike latencies and jitters. **A**, Simulations with latency differences. The left panel shows PSTHs corresponding to the first spikes of a representative neuron in which the imposed latency difference between the responses to the stimuli is 0 ms. The right panel shows PSTHs corresponding to the responses of the same neuron when the latency difference is increased. **B**, Simulations with overall jitters. The left panel shows PSTHs corresponding to the first spikes of a representative neuron with physiological values of latencies and jitters. The right panel shows PSTHs corresponding to the responses of the same neuron when the jitters are increased. **C**, Simulations with jitter differences. The left panel shows PSTHs corresponding to the first spikes of a representative neuron in which the imposed latency difference is 0 ms. The right panel shows PSTHs corresponding to the responses of the same neuron when the jitter difference between the responses to the stimuli is increased. **D**, The information conveyed by the responses increases as the latency difference is increased and decreases as the jitters are increased. **E**, Spike timing information increases as the jitter difference increases, but only when the latency difference is close to zero.

gesting that any information conveyed by correlations between spikes was at most redundant to the information conveyed by first spikes.

The coding problem addressed in this study was to discriminate what stimulus occurred assuming that a stimulus did occur (see supplemental Results, available at www.jneurosci.org as supplemental material) and that stimulus onset was known. All our analyses thus assume an external temporal reference, which is a common assumption in the field (VanRullen et al., 2005). This assumption implies that the brain should have an equivalent internal temporal reference to decode the information in the spike timing codes described here. Intuitively, when a tactile stimulus is delivered, the brain could use the global thalamic response to generically detect that a stimulus occurred. It would then be feasible to use, for example, the beginning of such global response as an internal temporal reference to construct and decode latency codes for finer stimulus discrimination. Indeed, several works are now proposing possible internal references, including spikes emitted by other neurons (Chase and Young, 2007; Gollisch and Meister, 2008) or—less likely in our case—a specific phase in the oscillations of local field potentials (Huxter et al., 2003; Buzsáki and Draguhn, 2004; Lee et al., 2005; Lisman, 2005; Fries et al., 2007; Montemurro et al., 2008). Importantly, spike timing information can even increase when an internal reference is used (Chase and Young, 2007), confirming that the knowledge of stimulus onset is not a limiting assumption.

Spike timing information in the ventrobasal complex of the thalamus

Two previous studies have shown that in the VPM spike timing conveys more information than spike count alone in the discrimination of stimulus location (Ghazanfar et al., 2000) and in the discrimination of stimulus dynamics (Montemurro et al., 2007), suggesting the presence of temporal information that was independent of spike count information. Here, we extended these results from the VPM to the VPL, thus bringing at the informational level the homogeneity that we previously investigated at the neurophysiologic level (Aguilar et al., 2008). Temporal information about stimulus dynamics in the ventrobasal complex implies that at least part of the remarkable spike timing precision observed in the responses of primary afferents to transient stimuli (Jones et al., 2004a, 2004b) is preserved in the thalamus (Desbordes et al., 2008; Petersen et al., 2008). Temporal information about stimulus location is trickier. Primary afferents selectively respond to a very circumscribed body area, e.g., one digit or one whisker (Leiser and Moxon, 2006). Primary afferents could thus exploit the spike timing precision of their responses only to discriminate between close locations within the body area they represent, e.g., within a fingertip (Johansson and Birznieks, 2004), but not to discriminate between separate locations such as different digits or different whiskers. Temporal information conveyed by spike timing about stimulus location between digits or between whiskers in the ventrobasal complex is thus a product of the basic transformations that occur in the brainstem (Panetsos et al., 1997; Aguilar et al., 2002, 2003; Fernández de Sevilla et al., 2006; Soto et al., 2006), which determine the enlargement of receptive fields at thalamic level. Importantly, the receptive field size of thalamocortical neurons is particularly large in active or awake states (Nicolelis et al., 1993; Nicolelis and Chapin, 1994; Friedberg et al., 1999; Aguilar and Castro-Alamancos, 2005). Larger receptive fields imply greater temporal information (Foffani et al., 2008), so the relative weight of temporal information over spike count information observed here in anesthetized con-

ditions is expected to increase in awake animals. Although our experimental anesthetized conditions represent a good model of passive unexpected stimuli during quiet behaviors (Krupa et al., 2004; Perekou et al., 2006), it is important to remark that inferences about how stimuli are processed by behaving animals based on anesthetized data should be cautious. Nevertheless, the loss of spatial selectivity resulting from the large receptive fields—not only in the thalamus but also in the cortex (Ghazanfar and Nicolelis, 1999; Tutunculer et al., 2006; Moxon et al., 2008)—could be the price paid by sensory systems to fully benefit from the high information capacity of spike timing codes (Foffani et al., 2008).

Spike timing information, spike count information, and temporal information

A few recent studies hint at the intuitive idea of spike timing becoming particularly informative when the stimuli to be discriminated evoke similar response magnitudes (Arabzadeh et al., 2006; Foffani et al., 2008; Montemurro et al., 2008). In the present study, we explicitly considered that spike timing information includes both spike count information (how many spikes occurred) and temporal information (when they occurred), i.e., $I_{\text{spike-timing}} = I_{\text{spike-count}} + I_{\text{temporal}} + \Delta I$ (Nelken et al., 2005). Indeed, the experimental observation of different stimuli leading to similar spike counts with different latencies represents a limit case that is useful to intuitively show that temporal information can be much greater than count information. But the significance of our results is more general: using first spikes of responsive trials we were able to disambiguate the redundancy between temporal information and spike count information, showing that temporal information alone can be greater than spike count information even if different stimuli elicit rather different spike counts. The additional information obtained with spike timing compared with spike count in previous studies in the somatosensory system was therefore likely underestimating the real temporal information present in the code.

Informational contribution of first-spike latencies and jitters

In the somatosensory system and even in other sensory modalities, the very first spike emitted by single neurons in each single-trial response seems to convey most of the information about stimulus discrimination (Heil, 1997; Panzeri et al., 2001; Petersen et al., 2001; Furukawa and Middlebrooks, 2002; DeWeese et al., 2003; Foffani et al., 2004, 2008; Johansson and Birznieks, 2004; Nelken et al., 2005; Gollisch and Meister, 2008). First-spike coding is functionally appealing for rapid processing of sensory information (Thorpe et al., 2001; VanRullen et al., 2005), and is methodologically attractive because one spike represents the minimal element that is necessary to construct a spike timing code. In our data first spikes conveyed virtually all temporal information, suggesting that first-spike coding can operate in the ventrobasal complex of the thalamus. Our computational experiments confirm that temporal information is primarily caused by latency differences between the responses to different stimuli. These results support the importance of response latency as a fundamental element of the neural code (Amassian, 1953; Jones 1956; Gawne et al., 1996; Eggermont, 1998; Raiguel et al., 1999; Oram et al., 2002; Hurley and Pollak, 2005; Thomson and Kristan, 2006; Gollisch and Meister, 2008; Foffani et al., 2008).

Beside latencies, jitters clearly play a crucial role in neural codes based on spike timing (Mainen and Sejnowski, 1995; Berry et al., 1997; Hunter et al., 1998; Cecchi et al., 2000; Fellous et al., 2001; Szűcs et al., 2004; Aldworth et al., 2005; Rokem et al., 2006;

Billimoria et al., 2006; Daw et al., 2006; Tiesinga et al., 2008). Our computational experiments formalize the intuitive idea of large jitters being detrimental for the information conveyed by latency differences. Importantly, increasing the jitter of the neural responses is also equivalent to increasing the jitter of the “clock” that the brain would need as an internal reference to decode spike timing information. Our simulations thus provide rigorous boundaries to the precision required for candidate clocks to extract temporal information from latency differences.

Our computational experiments also uncover a more subtle informational contribution by jitter differences between the responses to different stimuli. Jitter differences, however, can only contribute information if latency differences are close to zero. This suggests that jitter differences might be more difficult to be exploited at a functional level, whereas temporally precise first spikes synchronously emitted by multiple neurons within the same aggregate could be particularly efficient for transmitting tactile information from the thalamus to the somatosensory cortex (Bruno and Sakmann, 2006).

In conclusion, temporal information conveyed by spike timing can be higher than spike count information for the discrimination of somatosensory stimuli in the rat ventrobasal complex.

References

- Adrian ED (1928) The basis of sensations. New York: Norton.
- Aguilar J, Soto C, Rivadulla C, Canedo A (2002) The lemniscal-cuneate recurrent excitation is suppressed by strychnine and enhanced by GABA antagonists in the anesthetized cat. *Eur J Neurosci* 16:1697–1704.
- Aguilar J, Rivadulla C, Soto C, Canedo A (2003) New corticocuneate cellular mechanisms underlying the modulation of cutaneous ascending transmission in anesthetized cats. *J Neurophysiol* 89:3328–3339.
- Aguilar J, Morales-Botello ML, Foffani G (2008) Tactile responses of hindpaw, forepaw and whisker neurons in the thalamic ventrobasal complex of anesthetized rats. *Eur J Neurosci* 27:378–387.
- Aguilar JR, Castro-Alamancos MA (2005) Spatiotemporal gating of sensory inputs in thalamus during quiescent and activated states. *J Neurosci* 25:10990–11002.
- Aldworth ZN, Miller JP, Gedeon T, Cummins GI, Dimitrov AG (2005) De-jittered spike-conditioned stimulus waveforms yield improved estimates of neuronal feature selectivity and spike-timing precision of sensory interneurons. *J Neurosci* 25:5323–5332.
- Amassian VE (1953) Evoked single cortical unit activity in the somatic sensory areas. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 5:415–438.
- Arabzadeh E, Panzeri S, Diamond ME (2006) Deciphering the spike train of a sensory neuron: counts and temporal patterns in the rat whisker pathway. *J Neurosci* 26:9216–9226.
- Berry MJ, Warland DK, Meister M (1997) The structure and precision of retinal spike trains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:5411–5416.
- Bialek W, Rieke F, de Ruyter van Steveninck RR, Warland D (1991) Reading a neural code. *Science* 252:1854–1857.
- Billimoria CP, DiCaprio BA, Birmingham JT, Abbott LF, Marder E (2006) Neuromodulation of spike-timing precision in sensory neurons. *J Neurosci* 26:5910–5919.
- Blanc JL, Coq JO (2007) Coding processes involved in the cortical representation of complex tactile stimuli. *J Physiol Paris* 101:22–31.
- Borst A, Theunissen FE (1999) Information theory and neural coding. *Nat Neurosci* 2:947–957.
- Bruno RM, Sakmann B (2006) Cortex is driven by weak but synchronously active thalamocortical synapses. *Science* 312:1622–1627.
- Butts DA, Weng C, Jin J, Yeh CI, Lesica NA, Alonso JM, Stanley GB (2007) Temporal precision in the neural code and the timescales of natural vision. *Nature* 449:92–95.
- Buzsáki G, Draguhn A (2004) Neuronal oscillations in cortical networks. *Science* 304:1926–1929.
- Cecchi GA, Sigman M, Alonso JM, Martínez L, Chialvo DR, Magnasco MO (2000) Noise in neurons is message dependent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:5557–5561.
- Chase SM, Young ED (2006) Spike-timing codes enhance the representation of multiple simultaneous sound-localization cues in the inferior colliculus. *J Neurosci* 26:3889–3898.
- Chase SM, Young ED (2007) First-spike latency information in single neurons increases when referenced to population onset. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:5175–5180.
- Daw MI, Bannister NV, Isaac JTR (2006) Rapid, activity-dependent plasticity in timing precision in neonatal barrel cortex. *J Neurosci* 26:4178–4187.
- deCharms RC, Merzenich MM (1996) Primary cortical representation of sounds by the coordination of action-potential timing. *Nature* 381:610–613.
- de Ruyter van Steveninck RR, Lewen GD, Strong SP, Koberle R, Bialek W (1997) Reproducibility and variability in neural spike trains. *Science* 275:1805–1808.
- Desbordes G, Jin J, Weng C, Lesica NA, Stanley GB, Alonso JM (2008) Timing precision in population coding of natural scenes in the early visual system. *PLoS Biol* 6:e324.
- Deschênes M, Timofeeva E, Lavallée P (2003) The relay of high-frequency sensory signals in the whisker-to-barreloid pathway. *J Neurosci* 23:6778–6787.
- DeWeese MR, Wehr M, Zador AM (2003) Binary spiking in auditory cortex. *J Neurosci* 23:7940–7949.
- Eggermont JJ (1998) Azimuth coding in primary auditory cortex of the cat. II. Relative latency and interspike interval representation. *J Neurophysiol* 80:2151–2161.
- Engineer CT, Perez CA, Chen YH, Carraway RS, Reed AC, Shetake JA, Jakka-msetti V, Chang KQ, Kilgard MP (2008) Cortical activity patterns predict speech discrimination ability. *Nat Neurosci* 11:603–608.
- Fellous JM, Houweling AR, Modi RH, Rao RP, Tiesinga PH, Sejnowski TJ (2001) Frequency dependence of spike timing reliability in cortical pyramidal cells and interneurons. *J Neurophysiol* 85:1782–1787.
- Ferezou I, Bolea S, Petersen CC (2006) Visualizing the cortical representation of whisker touch: voltage-sensitive dye imaging in freely moving mice. *Neuron* 50:617–629.
- Fernández de Sevilla D, Rodrigo-Angulo M, Nuñez A, Buño W (2006) Cholinergic modulation of synaptic transmission and postsynaptic excitability in the rat gracilis dorsal column nucleus. *J Neurosci* 26:4015–4025.
- Foffani G, Moxon KA (2004) PSTH-based classification of sensory stimuli using ensembles of single neurons. *J Neurosci Methods* 135:107–120.
- Foffani G, Tutunculer B, Moxon KA (2004) Role of spike timing in the forelimb somatosensory cortex of the rat. *J Neurosci* 24:7266–7271.
- Foffani G, Chapin JK, Moxon KA (2008) Computational role of large receptive fields in the primary somatosensory cortex. *J Neurophysiol* 100:268–280.
- Friedberg MH, Lee SM, Ebner FF (1999) Modulation of receptive field properties of thalamic somatosensory neurons by the depth of anesthesia. *J Neurophysiol* 81:2243–2252.
- Fries P, Nikolaić D, Singer W (2007) The gamma cycle. *Trends Neurosci* 30:309–316.
- Furukawa S, Middlebrooks JC (2002) Cortical representation of auditory space: information-bearing features of spike patterns. *J Neurophysiol* 87:1749–1762.
- Gawne TJ, Kjaer TW, Richmond BJ (1996) Latency: another potential code for feature binding in striate cortex. *J Neurophysiol* 76:1356–1360.
- Ghazanfar AA, Nicolelis MA (1999) Spatiotemporal properties of layer V neurons of the rat primary somatosensory cortex. *Cereb Cortex* 9:348–361.
- Ghazanfar AA, Stambaugh CR, Nicolelis MA (2000) Encoding of tactile stimulus location by somatosensory thalamocortical ensembles. *J Neurosci* 20:3761–3775.
- Gollisch T, Meister M (2008) Rapid neural coding in the retina with relative spike latencies. *Science* 319:1108–1111.
- Gutiérrez R, Carmona JM, Nicolelis MA, Simon SA (2006) Orbitofrontal ensemble activity monitors licking and distinguishes among natural rewards. *J Neurophysiol* 95:119–133.
- Heil P (1997) Auditory cortical onset response revisited. I. First-spike timing. *J Neurophysiol* 77:2616–2641.
- Hopfield JJ (1995) Pattern recognition computation using action potential timing for stimulus representation. *Nature* 376:33–36.
- Hunter JD, Milton JG, Thomas PJ, Cowan JD (1998) Resonance effect for neural spike time reliability. *J Neurophysiol* 80:1427–1438.

- Hurley LM, Pollak GD (2005) Serotonin shifts first-spike latencies of inferior colliculus neurons. *J Neurosci* 25:7876–7886.
- Huxter J, Burgess N, O'Keefe J (2003) Independent rate and temporal coding in hippocampal pyramidal cells. *Nature* 425:828–832.
- Johansson RS, Birznieks I (2004) First spikes in ensembles of human tactile afferents code complex spatial fingertip events. *Nat Neurosci* 7:170–177.
- Jones FN (1956) Space-time relationships in somesthetic localization. *Science* 124:484.
- Jones LM, Depireux DA, Simons DJ, Keller A (2004a) Robust temporal coding in the trigeminal system. *Science* 304:1986–1989.
- Jones LM, Lee S, Trageser JC, Simons DJ, Keller A (2004b) Precise temporal responses in whisker trigeminal neurons. *J Neurophysiol* 92:665–668.
- Kjaer TW, Hertz JA, Richmond BJ (1994) Decoding cortical neuronal signals: network models, information estimation and spatial tuning. *J Comput Neurosci* 1:109–139.
- Krupa DJ, Wiest MC, Shuler MG, Laubach M, Nicolelis MA (2004) Layer-specific somatosensory cortical activation during active tactile discrimination. *Science* 304:1989–1992.
- Lee H, Simpson GV, Logothetis NK, Rainer G (2005) Phase locking of single neuron activity to theta oscillations during working memory in monkey extrastriate visual cortex. *Neuron* 45:147–156.
- Leiser SC, Moxon KA (2006) Relationship between physiological response type (RA and SA) and vibrissa receptive field of neurons within the rat trigeminal ganglion. *J Neurophysiol* 95:3129–3145.
- Lisman J (2005) The theta/gamma discrete phase code occurring during the hippocampal phase precession may be a more general brain coding scheme. *Hippocampus* 15:913–922.
- MacKay DM, McCulloch WS (1952) The limiting information capacity of a neuronal link. *Bull Math Biophys* 14:127–135.
- Mainen ZF, Sejnowski TJ (1995) Reliability of spike timing in neocortical neurons. *Science* 268:1503–1506.
- Malone BJ, Scott BH, Semple MN (2007) Dynamic amplitude coding in the auditory cortex of awake rhesus macaques. *J Neurophysiol* 98:1451–1474.
- Montemurro MA, Panzeri S, Maravall M, Alenda A, Bale MR, Brambilla M, Petersen RS (2007) Role of precise spike timing in coding of dynamic vibrissa stimuli in somatosensory thalamus. *J Neurophysiol* 98:1871–1882.
- Montemurro MA, Rasch MJ, Murayama Y, Logothetis NK, Panzeri S (2008) Phase-of-firing coding of natural visual stimuli in primary visual cortex. *Curr Biol* 18:375–380.
- Moxon KA, Hale LL, Aguilar J, Foffani G (2008) Responses of infragranular neurons in the rat primary somatosensory cortex to forepaw and hindpaw tactile stimuli. *Neuroscience* 156:1083–1092.
- Nelken I, Chechik G, Msracik-Flogel TD, King AJ, Schnupp JW (2005) Encoding stimulus information by spike numbers and mean response time in primary auditory cortex. *J Comput Neurosci* 19:199–221.
- Nemenman I, Lewen GD, Bialek W, de Ruyter van Steveninck RR (2008) Neural coding of natural stimuli: information at sub-millisecond resolution. *PLoS Comput Biol* 4:e1000025.
- Nicolelis MA, Chapin JK (1994) Spatiotemporal structure of somatosensory responses of many-neuron ensembles in the rat ventral posterior medial nucleus of the thalamus. *J Neurosci* 14:3511–3532.
- Nicolelis MA, Lin RC, Woodward DJ, Chapin JK (1993) Dynamic and distributed properties of many-neuron ensembles in the ventral posterior medial thalamus of awake rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:2212–2216.
- Opticam LM, Richmond BJ (1987) Temporal encoding of two-dimensional patterns by single units in primate inferior temporal cortex. *J Neurophysiol* 57:162–178.
- Oram MW, Xiao DK, Drietschel B, Payne KR (2002) The temporal precision of neural signals: a unique role for response latency? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 357:987–997.
- Panetsos F, Nuñez A, Avendaño C (1997) Electrophysiological effects of temporary deafferentation on two characterized cell types in the nucleus gracilis of the rat. *Eur J Neurosci* 9:563–572.
- Panzeri S, Petersen RS, Schultz SR, Lebedev M, Diamond ME (2001) The role of spike timing in the coding of stimulus location in rat somatosensory cortex. *Neuron* 29:769–777.
- Panzeri S, Senatore R, Montemurro MA, Petersen RS (2007) Correcting for the sampling bias problem in spike train information measures. *J Neurophysiol* 98:1064–1072.
- Petersen RS, Panzeri S, Diamond ME (2001) Population coding of stimulus location in rat somatosensory cortex. *Neuron* 32:503–514.
- Petersen RS, Brambilla M, Bale MR, Alenda A, Panzeri S, Montemurro MA, Maravall M (2008) Diverse and temporally precise kinetic feature selectivity in the VPM thalamic nucleus. *Neuron* 60:890–903.
- Raiguel SE, Xiao D, Marcar VL, Orban GA (1999) Response latency of macaque area MT/V5 neuron and its relationship to stimulus parameters. *J Neurophysiol* 44:295–311.
- Reich DS, Mechler F, Victor JD (2001) Temporal coding of contrast in primary visual cortex: when, what, and why. *J Neurophysiol* 85:1039–1050.
- Rokem A, Watzl S, Gollisch T, Stemmler M, Herz AV, Samengo I (2006) Spike-timing precision underlies the coding efficiency of auditory receptor neurons. *J Neurophysiol* 95:2541–2552.
- Rolls ET, Treves A, Tovee MJ (1997) The representational capacity of the distributed encoding of information provided by populations of neurons in primate temporal visual cortex. *Exp Brain Res* 114:149–162.
- Schneidman E, Bialek W, Berry MJ 2nd (2003) Synergy, redundancy, and independence in population codes. *J Neurosci* 23:11539–11553.
- Soto C, Martin-Cora F, Leiras R, Velo P, Canedo A (2006) GABA(B) receptor-mediated modulation of cutaneous input at the cuneate nucleus in anesthetized cats. *Neuroscience* 137:1015–1030.
- Szücs A, Vehovszky A, Molnar G, Pinto RD, Abarbanel HD (2004) Reliability and precision of neural spike timing: simulation of spectrally broadband synaptic inputs. *Neuroscience* 126:1063–1073.
- Thomson EE, Kristan WB (2006) Encoding and decoding touch location in the leech CNS. *J Neurosci* 26:8009–8016.
- Thorpe S, Delorme A, Van Rullen R (2001) Spike-based strategies for rapid processing. *Neural Netw* 14:715–725.
- Tiesinga P, Fellous JM, Sejnowski TJ (2008) Regulation of spike timing in visual cortical circuits. *Nat Rev Neurosci* 9:97–109.
- Tutunculer B, Foffani G, Himes BT, Moxon KA (2006) Structure of the excitatory receptive fields of infragranular forelimb neurons in the rat primary somatosensory cortex responding to touch. *Cereb Cortex* 16:791–810.
- VanRullen R, Guyonnet R, Thorpe SJ (2005) Spike times make sense. *Trends Neurosci* 28:1–4.
- Victor JD, Purpura KP (1996) Nature and precision of temporal coding in visual cortex: a metric-space analysis. *J Neurophysiol* 76:1310–1326.

Imaging the Spatio-Temporal Dynamics of Supragranular Activity in the Rat Somatosensory Cortex in Response to Stimulation of the Paws

M. L. Morales-Botello¹, J. Aguilar¹, G. Foffani^{1,2*}

¹Hospital Nacional de Paraplégicos, Servicio de Salud de Castilla-La Mancha, Toledo, Spain, ²School of Biomedical Engineering, Science, and Health Systems, Drexel University, Philadelphia, Pennsylvania, United States of America

Abstract

We employed voltage-sensitive dye (VSD) imaging to investigate the spatio-temporal dynamics of the responses of the supragranular somatosensory cortex to stimulation of the four paws in urethane-anesthetized rats. We obtained the following main results. (1) Stimulation of the contralateral forepaw evoked VSD responses with greater amplitude and smaller latency than stimulation of the contralateral hindpaw, and ipsilateral VSD responses had a lower amplitude and greater latency than contralateral responses. (2) While the contralateral stimulation initially activated only one focus, the ipsilateral stimulation initially activated two foci: one focus was typically medial to the focus activated by contralateral stimulation and was stereotactically localized in the motor cortex; the other focus was typically posterior to the focus activated by contralateral stimulation and was stereotactically localized in the somatosensory cortex. (3) Forepaw and hindpaw somatosensory stimuli activated large areas of the sensorimotor cortex, well beyond the forepaw and hindpaw somatosensory areas of classical somatotopic maps, and forepaw stimuli activated larger cortical areas with greater activation velocity than hindpaw stimuli. (4) Stimulation of the forepaw and hindpaw evoked different cortical activation dynamics: forepaw responses displayed a clear medial directionality, whereas hindpaw responses were much more uniform in all directions. In conclusion, this work offers a complete spatio-temporal map of the supragranular VSD cortical activation in response to stimulation of the paws, showing important somatotopic differences between contralateral and ipsilateral maps as well as differences in the spatio-temporal activation dynamics in response to forepaw and hindpaw stimuli.

Citation: Morales-Botello ML, Aguilar J, Foffani G (2012) Imaging the Spatio-Temporal Dynamics of Supragranular Activity in the Rat Somatosensory Cortex in Response to Stimulation of the Paws. PLoS ONE 7(7): e40174. doi:10.1371/journal.pone.0040174

Editor: Manuel S. Malmierca, University of Salamanca- Institute for Neuroscience of Castilla and Leon and Medical School, Spain

Received: January 31, 2012; **Accepted:** June 3, 2012; **Published:** July 19, 2012

Copyright: © 2012 Morales-Botello et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by FISCAM (Gobierno de Castilla-La Mancha) MOV-2008/JI/9 and Fondo de Investigación Sanitaria del Instituto de Salud Carlos III PI08/1852 PI11/02451 (Spain), co-funded by FEDER (Fondo Europeo de Desarrollo Regional). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: guglielmo.foffani@drexel.edu

Introduction

To understand the basic elements of cortical somatosensory processing, it is necessary to study the spatio-temporal dynamics of cortical activation in response to somatosensory stimuli. Signals evoked by somatosensory stimuli can enter the cortex through several layers [1,2,3], but the main input is the granular layer (layer 4) [1,4,5]. From here somatosensory signals are distributed within cortical columns to supragranular layers (layers 2/3) [6,7]. Supragranular layers then play a critical role in distributing the signals between cortical columns and to other regions involved in sensorimotor processing [8,9,10].

The spatio-temporal dynamics of supragranular cortical activation have been widely investigated *in vivo* using a relatively recent imaging technique: voltage-sensitive dye (VSD) imaging. VSD imaging allows the simultaneous imaging of the activation of large cortical regions with excellent spatial and temporal resolution [11,12]. This resolution has made it possible to study in detail the spatio-temporal dynamics of spontaneous and evoked activation in the supragranular layers of the somatosensory cortex, especially in the barrel cortex [13–20]. More recently, VSD imaging has also been extended to the paw region of the primary somatosensory

cortex to investigate cortical reorganization after stroke in mice [21,22,23] and after spinal cord injury in rats [24,25,26]. However, the exact spatio-temporal dynamics of supragranular cortical activation in response to contralateral and ipsilateral stimulation of the forepaw and hindpaw in physiological conditions remain unclear.

Two main issues are particularly relevant to fully understand both cortical reorganization after injury and sensorimotor integration in physiological conditions (e.g. during locomotion): (1) the comparison of contralateral vs ipsilateral responses, and (2) the comparison of responses to forepaw vs hindpaw stimuli. On the one hand, ipsilateral responses could originate below the level of the thalamus [27,28], at thalamocortical level, or at cortical level from projections through the corpus callosum [29–32]. The presence of multiple possible pathways by which somatosensory inputs could reach the ipsilateral cortex suggest that the cortical map of the ipsilateral body might not be perfectly symmetrical to the cortical map of the contralateral body [33]. On the other hand, two main anatomical differences distinguish the forepaw and the hindpaw regions of the rat primary somatosensory cortex. First, the forepaw region is larger than the hindpaw region [34]. Second, the forepaw somatosensory cortex is mostly separated

from the corresponding region of the motor cortex, whereas most of the hindpaw somatosensory cortex overlaps with the corresponding region of the motor cortex [35,36]. Because of the known projections from the somatosensory cortex to the motor cortex [17,37–41], it therefore seems reasonable to hypothesize that the spatio-temporal dynamics of supragranular cortical activation in response to stimulation of the forepaw compared to stimulation of the hindpaw will be different.

In the present work we employed VSD imaging to investigate in detail the spatio-temporal dynamics of supragranular cortical activation in response to stimulation of the paws in normal urethane-anesthetized rats. Specifically, our main points of interest were: (1) to determine the supragranular VSD response amplitudes and latencies to stimulation of the four paws, (2) to compare the spatial representation of contralateral vs. ipsilateral VSD responses, (3) to assess the extent of cortical activation and the amount of overlap between the forepaw and hindpaw regions, and (4) to compare the directionality in the cortical activation dynamics between forepaw and hindpaw stimuli. This study provides a complete description of the spatio-temporal dynamics of VSD activation of the rat supragranular somatosensory cortex in response to stimulation of the paws.

Results

VSD Imaging of Cortical Somatosensory Responses

The VSD signal is proportional to the membrane potential changes and to the membrane area of the neuronal elements stained under each measured pixel [12,42]. In vivo, this signal primarily represents the activity of the supragranular layers 2/3 [13,43,44] and, more specifically, the dendritic activity of pyramidal cells because they provide the greatest contribution to the imaged membrane area [11,12,13]. However, VSD is not sensitive to spikes, as they make up a small percentage of the total change of the measured membrane potential [13,45]. Rather, VSD signals are similar (proportional) to the local field potential recorded electrophysiologically [12,13,18,43,45,46]. Both represent population activity, and both methods can measure with good temporal resolution (VSD imaging reaches 0.1 ms). However, VSD imaging also makes it possible to simultaneously image a wide cortical region with great spatial resolution ($>50\ \mu\text{m}$) [12]. This would be equivalent to placing 10,000 electrodes in a 5-mm \times 5-mm area. Here we employed VSD imaging to record the activation of the rat supragranular somatosensory cortex in response to electrical stimuli at high intensity (6 mA) and low intensity (0.6 mA) separately delivered to the four paws (Fig. 1). We will first provide a qualitative description of the cortical activation dynamics using a representative example (Fig. 2).

Stimulation of the contralateral forepaw (Fig. 2A) initially activated a region that was more anterior and lateral compared to the region initially activated by stimulation of the contralateral hindpaw (Fig. 2B). The separation between these initially activated regions, which we define as foci, was approximately 2 mm. This is consistent with the known somatotopic organization of the rat primary somatosensory cortex. Within a few milliseconds, the activation expanded and reached beyond the somatosensory cortex to a large extent. This expansion was not uniform, but it occurred in two principal directions: most importantly in the medial direction but also in the posterior direction. The non-uniform directionality was more clearly observable in response to forepaw stimuli than in response to hindpaw stimuli.

Unlike contralateral stimulation, ipsilateral stimulation initially activated two foci that were well separated and did not match with the contralateral stimulation focus (Fig. 2C,D). One of the

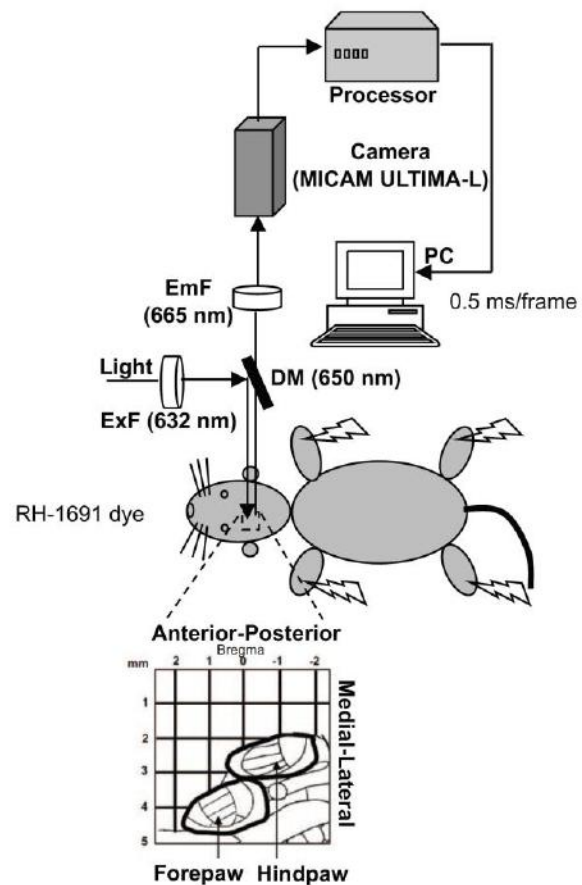


Figure 1. Experimental design. We imaged the VSD signals from the somatosensory cortex of one hemisphere of the rat in response to electrical stimulation of the paws. To image the VSD signals, the light was band-pass filtered at 632 nm by an excitation filter (ExF) and reflected toward the cortex by a 650 nm dichroic mirror (DM). The emitted fluorescence was transmitted through the dichroic mirror, subsequently long-pass filtered at 665 nm by an emission filter (EmF), and finally imaged using a MICAM ULTIMA-L system composed by a high-speed camera and a corresponding processor unit (BrainVision Inc.). A 5-mm \times 5-mm cortical area was imaged, as schematically represented at the bottom. The black lines delimit the forepaw and hindpaw regions in the somatotopic map of the rat primary somatosensory cortex.

doi:10.1371/journal.pone.0040174.g001

ipsilateral foci was medial to the contralateral focus and was localized within the motor cortex. The other ipsilateral focus was posterior and was localized within the somatosensory cortex. Within few milliseconds, the activations from these foci extended, joining together and reaching a large cortical region, although the overall extension was smaller compared to contralateral stimulation.

In the following sections, we will first show the quantitative results concerning the response measures that are typically employed in electrophysiological studies, such as response amplitudes and response latencies. Then, we will show the quantitative results regarding the spatio-temporal aspects of the cortical activation, which are possible to measure using VSD imaging.

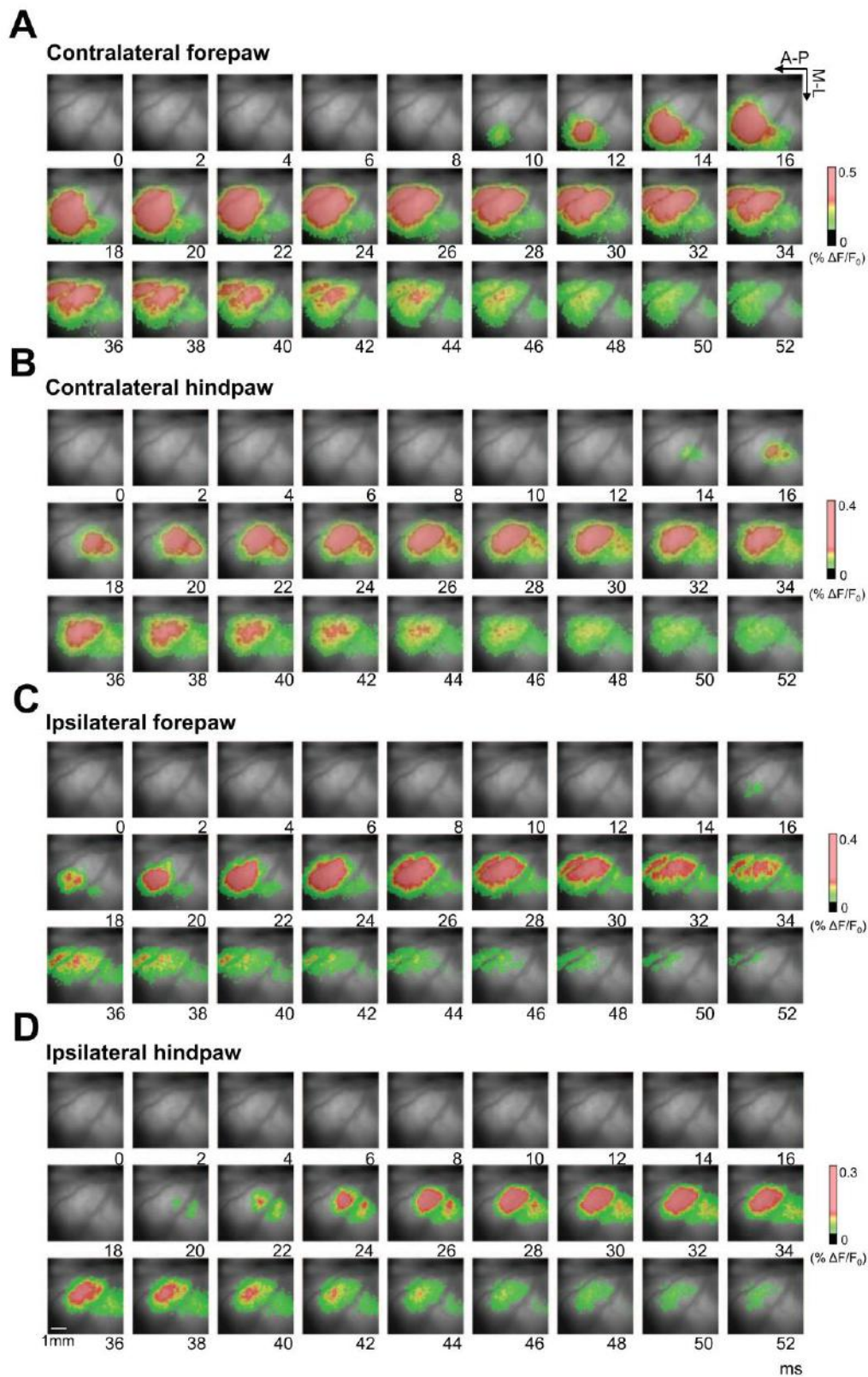


Figure 2. VSD imaging of cortical somatosensory responses. Cortical activation dynamics evoked by high intensity stimulation of the contralateral forepaw (A), contralateral hindpaw (B), ipsilateral forepaw (C) and ipsilateral hindpaw (D) in the first 50 ms after the stimuli (0 represent the stimulus onset) in a representative animal. The arrows indicate the anterior-posterior and medial-lateral directions. Each image corresponds to the average of 30 trials. The initial activation evoked by stimulation of the contralateral forepaw and hindpaw corresponds to the somatotopic map of the rat primary somatosensory cortex, however, we found a different somatotopic map in the activation evoked by stimulation of the ipsilateral paws. In few milliseconds the activation expanded reaching large cortical regions, with a different directionality between forepaw and hindpaw cortex. doi:10.1371/journal.pone.0040174.g002

Amplitudes and Latencies of Cortical Somatosensory VSD Responses

We applied electrical stimuli to the rats' paws, and we measured the amplitude, initial latency and peak latency of the responses (see Material and methods). Fig. 3A shows an example of cortical activation by high intensity stimulation of the contralateral and ipsilateral paws ~2–3 ms after the initial activation – and Fig. 3B shows the temporal evolution of the VSD responses in the points of maximal intensity of the foci. The amplitude, initial latency and peak latency in response to high- and low-intensity stimuli are reported in Table 1.

The VSD response amplitude to contralateral forepaw stimuli was significantly larger than to contralateral hindpaw stimuli (two-way ANOVA, forepaw-hindpaw factor: $p = 0.0430$, $n = 9$) (Fig. 3C,D) and was significantly larger with high-intensity than with low-intensity stimuli (two-way ANOVA, high intensity-low intensity factor: $p = 0.0308$, $n = 9$). The VSD response latency was significantly shorter for contralateral forepaw stimuli than for contralateral hindpaw stimuli (two-way ANOVA, forepaw-hindpaw factor; initial latency: $p < 0.0001$, $n = 9$; peak latency: $p = 0.0004$, $n = 9$) (Fig. 3C) and was shorter with high-intensity than with low-intensity stimuli (two-way ANOVA, high intensity-low intensity factor; initial latency: $p < 0.0001$, $n = 9$; peak latency: $p = 0.0002$, $n = 9$).

To consistently compare the responses to ipsilateral and contralateral stimulation, we also selected the focus with maximal signal value in response to ipsilateral stimulation, and we determined the response amplitude and response latency. In comparison with contralateral stimuli, the response amplitudes evoked by ipsilateral stimuli were significantly smaller (two-way ANOVA, contralateral ($n = 9$)-ipsilateral ($n = 6$) factor: $p = 0.0082$), and the latencies were significantly larger (two-way ANOVA, contralateral ($n = 9$)-ipsilateral ($n = 6$) factor: $p < 0.0001$ for both initial and peak latency) (Fig. 3C,D).

To investigate possible differences between the responses in the two foci evoked by ipsilateral stimulation, we selected the point with maximal signal value in each of the foci (medial and posterior), and we studied the response amplitude and response latency of these points. We found that the response amplitude was slightly larger in the medial (motor) than in the posterior (somatosensory) focus (two-way ANOVA, medial focus-posterior focus factor: $p = 0.0334$, $n = 6$; forepaw-hindpaw factor: $p = 1.00$, $n = 9$; interaction: $p = 0.077$), but interestingly, the half-peak response latency in the posterior (somatosensory) focus was smaller than in the medial (motor) focus (two-way ANOVA, medial focus-posterior focus factor: $p = 0.0040$, $n = 6$; forepaw-hindpaw factor: $p = 0.0118$, $n = 9$; interaction: $p = 0.63$) (Fig. 3E). The amplitude and latencies of the responses to ipsilateral stimuli, separating the two foci, are reported in Table 2. Initial contralateral and ipsilateral activation maps from all the animals are reported in Fig. 3F,G.

Extent of Cortical Somatosensory VSD Responses

The somatosensory stimuli initially evoked a localized activation that later spread to larger cortical regions beyond the somatosensory cortex.

First, we calculated the area of the cortical region activated by stimulation of the contralateral forepaw and hindpaw during the first one hundred milliseconds of the response (Fig. 4A,B). The maximal activated area due to forepaw stimulation was larger than that due to hindpaw stimulation (two-way ANOVA, forepaw-hindpaw factor: $p = 0.0084$, $n = 9$). The maximal activated area using a high-intensity stimulus was larger than when using a low-intensity stimulus (two-way ANOVA, high intensity-low intensity factor: $p = 0.0006$, $n = 9$). The corresponding values of the maximal activated areas and the latency at which the maximal area was reached are reported in Table 3. Similar differences were observed for the maximal activated areas due to ipsilateral stimuli, which were overall smaller compared to contralateral stimuli (Fig. 4A,B).

The greater slope in the curve corresponding to the temporal evolution of the activated area in response to forepaw stimuli suggested a faster activation compared to hindpaw stimuli (Fig. 4A,B). To quantify the activation velocity, we calculated the derivative of the area with respect to time. The maximal activation velocity for contralateral forepaw stimulation was significantly larger than for hindpaw stimulation (two-way ANOVA, forepaw-hindpaw factor: $p = 0.0017$, $n = 9$) and was significantly larger using high-intensity compared with low-intensity stimulation (two-way ANOVA, high intensity-low intensity factor: $p < 0.0001$, $n = 9$). The values of the maximal activation velocity are shown in Table 3.

The great extent of cortical activations in response to somatosensory stimuli suggested that a large overlap exists between the supragranular cortical regions activated by stimulation of the different paws. We quantified the overlap between the maximal activated areas due to contralateral forepaw and hindpaw stimulation (Fig. 4C). The maximal cortical overlap was larger with high-intensity than with low-intensity stimulation (t -test: $p = 0.0317$, $n = 9$). The values of maximal cortical overlap are reported in Table 3.

With high-intensity stimuli, the cortical activation evoked by contralateral forepaw stimulation reached the hindpaw focus in 100% of the animals, and the cortical activation evoked by hindpaw stimulation reached the forepaw focus in 44% of the animals (Fig. 4D). A stimulus to the forepaw evoked a VSD response in the hindpaw focus with an amplitude that was 61% smaller (t -test: $p < 0.0001$, $n = 9$) and 8.61 ± 2.88 ms slower (t -test: $p < 0.0001$, $n = 9$) than in the forepaw focus, and a stimulus to the hindpaw evoked a VSD response in the forepaw focus with an amplitude that was 67% smaller (t -test: $p = 0.0042$, $n = 4$) and 11.13 ± 4.80 ms slower (t -test: $p = 0.0037$, $n = 4$) than in the hindpaw focus. Taking into account the distance between the forepaw focus and hindpaw focus (2.15 ± 0.50 mm), we determined that the linear activation velocity from the forepaw focus to the hindpaw focus (0.12 ± 0.04 mm/ms, $n = 9$) was larger than the linear activation velocity from the hindpaw focus to the forepaw focus (0.08 ± 0.01 mm/ms, $n = 4$) (t -test: $p = 0.0112$).

Directionality of Cortical Somatosensory VSD Responses

The somatosensory stimuli evoked cortical activations that spread non-uniformly through the cortex. Here, we studied the

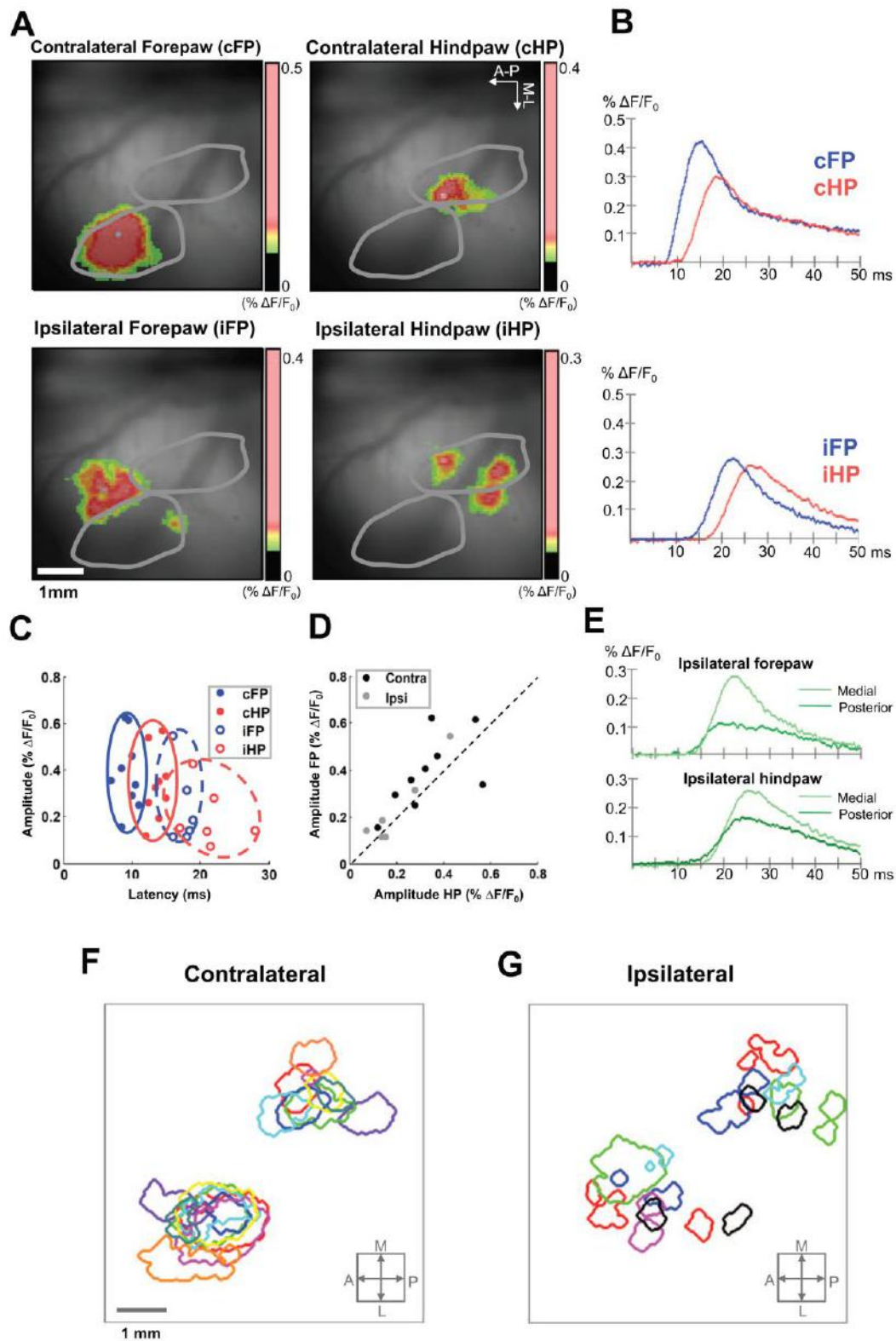


Figure 3. Amplitudes and latencies of cortical somatosensory VSD responses. (A) Cortical activation evoked by high-intensity stimulation of the paws in the first 2–3 ms after activation onset in a representative animal. The gray lines delimit the forepaw and hindpaw regions in the somatotopic map of the rat primary somatosensory cortex. The arrows indicate the anterior-posterior and medial-lateral directions. Ipsilateral stimuli activated two separate regions, one more medial and the other more posterior than the region activated by contralateral stimuli. (B) Temporal evolution of the responses in the corresponding points of maximal activation intensity. (C) Amplitude versus latency of the responses to stimulation of contralateral and ipsilateral paws represented for all rats. (D) Amplitude of the response to stimulation of the contralateral and ipsilateral forepaw with respect to the amplitude of the response to stimulation of contralateral and ipsilateral hindpaw, represented for all rats. Forepaw stimuli evoked responses with bigger amplitude and shorter latency compared with hindpaw stimuli (for both contralateral and ipsilateral stimuli). (E) Temporal evolution of the response in the point with maximal activation intensity in each of the two foci (medial and posterior to contralateral focus) evoked by stimulation of ipsilateral forepaw and hindpaw in a representative animal. The medial focus displayed larger amplitude but longer latency than the posterior focus. In all time axes, zero indicates stimulus onset. (F,G) Initial activation maps for high-intensity contralateral stimuli (F) and ipsilateral stimuli (G) from all animals. Antero-lateral activations (lower left) correspond to forepaw stimulation, postero-medial activations (upper right) correspond to hindpaw stimulation. Each color is a different animal. Because we did not have an external stereotaxic reference, for illustration purposes the initial activations (1 ms) were realigned so that for each activation the center of the image corresponds to focus activated by high-intensity stimulation of the opposite contralateral paw (i.e. the center of the image is the contralateral hindpaw focus for the initial activations evoked by both contralateral and ipsilateral forepaw stimuli, and it is the contralateral forepaw focus for the initial activation of both contralateral and ipsilateral hindpaw stimuli). doi:10.1371/journal.pone.0040174.g003

possible directionality of the activation dynamics, focusing on the response to contralateral stimulation. We first constructed contour maps of the temporal evolution of the activated region (see Materials and methods; Fig. 5A). We clearly observed a different directionality in the activation dynamics between forepaw and hindpaw stimulation.

To quantitatively study this directionality, we calculated the global activation center in each instant and followed its spatio-temporal evolution until the activated area reached the maximal value (see Material and methods; Fig. 5B; Table 4). The activation dynamics for forepaw stimulation involved a significant movement of the global activation center in the medial direction (*t*-test: medial-lateral, $p = 0.0001$, $n = 9$), and a tendency of smaller movement in the posterior direction (*t*-test: anterior-posterior, $p = 0.06$, $n = 9$). Conversely, there was no significant movement of the global activation center for hindpaw stimulation in either direction (*t*-test: medial-lateral, $p = 0.12$, $n = 9$; anterior-posterior, $p = 0.38$, $n = 9$).

As the spread was not uniform, the global activation center did not necessarily yield a complete description of the activation direction. Therefore, we followed the spatio-temporal evolution of the activation center in each of the four quadrants defined by the anterior-posterior and medial-lateral axes around the global activation center (see Material and methods; Fig. 5C; Table 4). Consistent with the results obtained in the previous paragraph, the spread of activation due to forepaw stimulation had a net evolution in the medial direction, whereas the spread of activation due to hindpaw stimulation was more homogeneous in all directions. Different directionality in the activation dynamics between forepaw and hindpaw stimulation. Similar differences of activation dynamics between forepaw and hindpaw stimulation were observed when we analyzed the responses to ipsilateral stimulation (Fig. 6).

Discussion

The aim of this study was to determine the spatio-temporal activation dynamics of the supragranular somatosensory cortex in response to stimulation of the paws in anesthetized rats using VSD imaging. Our main results suggest differences between the somatotopic cortical maps corresponding to the contralateral and ipsilateral paws and a different directionality in the activation dynamics in response to forepaw and hindpaw stimuli. These findings offer a complete spatio-temporal map of the VSD activation of the supragranular somatosensory cortex after stimulation of the paws in physiological conditions.

Amplitudes and Latencies of Cortical Somatosensory VSD Responses

Stimulation of the contralateral forepaw evoked VSD responses with greater amplitude and smaller latency than stimulation of the contralateral hindpaw. The latency difference is consistent with previous observations in the thalamus [47] and in the infragranular cortex [48] and is likely due to the greater distance from the hindpaw to the brain stem compared with the forepaw. The amplitude difference could be explained by the higher density of peripheral innervation of the forepaw compared to the hindpaw, which may correspond to a more extensive arborization through the superior levels [49]. In fact, at the cortical level, there is a more dense packing of pyramidal cells in the representation of the forepaw compared with the hindpaw [50]. Electrophysiological studies of the infragranular layers have similarly shown larger responses to forepaw stimulation compared with hindpaw stimulation both with single-neuron recordings [48] and with local field potentials [51]. Moreover, studies employing intrinsic optical imaging [52] and BOLD fMRI [53] have also shown the same result. Larger responses to forepaw compared to hindpaw

Table 1. Amplitudes and latencies of cortical VSD responses to electrical stimulation of the paws.

| | HIGH INTENSITY (6 mA) | | | LOW INTENSITY (0.6 mA) | | |
|-----|-----------------------|--------------|-------------------|------------------------|--------------|-------------------|
| | Amplitude (% DF/F) | Latency (ms) | Peak latency (ms) | Amplitude (% DF/F) | Latency (ms) | Peak latency (ms) |
| cFP | 0.39±0.16 | 9.40±0.65 | 16.67±2.98 | 0.28±0.15 | 16.20±7.21 | 27.56±7.83 |
| cHP | 0.33±0.15 | 13.50±1.22 | 20.06±1.88 | 0.19±0.11 | 23.20±5.13 | 33.61±11.33 |
| iFP | 0.24±0.17 | 17.58±1.28 | 24.50±2.30 | - | - | - |
| iHP | 0.20±0.13 | 21.42±3.72 | 30.67±4.40 | - | - | - |

(cFP = contralateral forepaw, cHP = contralateral hindpaw, iFP = ipsilateral forepaw, iHP = ipsilateral hindpaw). doi:10.1371/journal.pone.0040174.t001

Table 2. Amplitudes and latencies in the two foci of ipsilateral responses.

| | IPSILATERAL FOREPAW | | IPSILATERAL HINDPAW | |
|--|---------------------|------------------------|---------------------|------------------------|
| | Amplitude (% DF/F) | Half peak latency (ms) | Amplitude (% DF/F) | Half peak latency (ms) |
| Medial (motor) focus | 0.22±0.16 | 19.83±1.81 | 0.20±0.13 | 23.75±2.91 |
| Posterior (somatosensory) focus | 0.16±0.14 | 18.75±1.84 | 0.19±0.14 | 22.00±2.05 |

doi:10.1371/journal.pone.0040174.t002

stimuli could therefore represent a general property of the rat somatosensory system.

The responses to the stimulation of ipsilateral paws differed compared with the responses to contralateral stimulation in two

principal ways. First, the response to ipsilateral stimulation had a smaller amplitude and greater latency than the response to contralateral stimulation, as expected based on previous electrophysiological studies in the infragranular cortex [48,54].

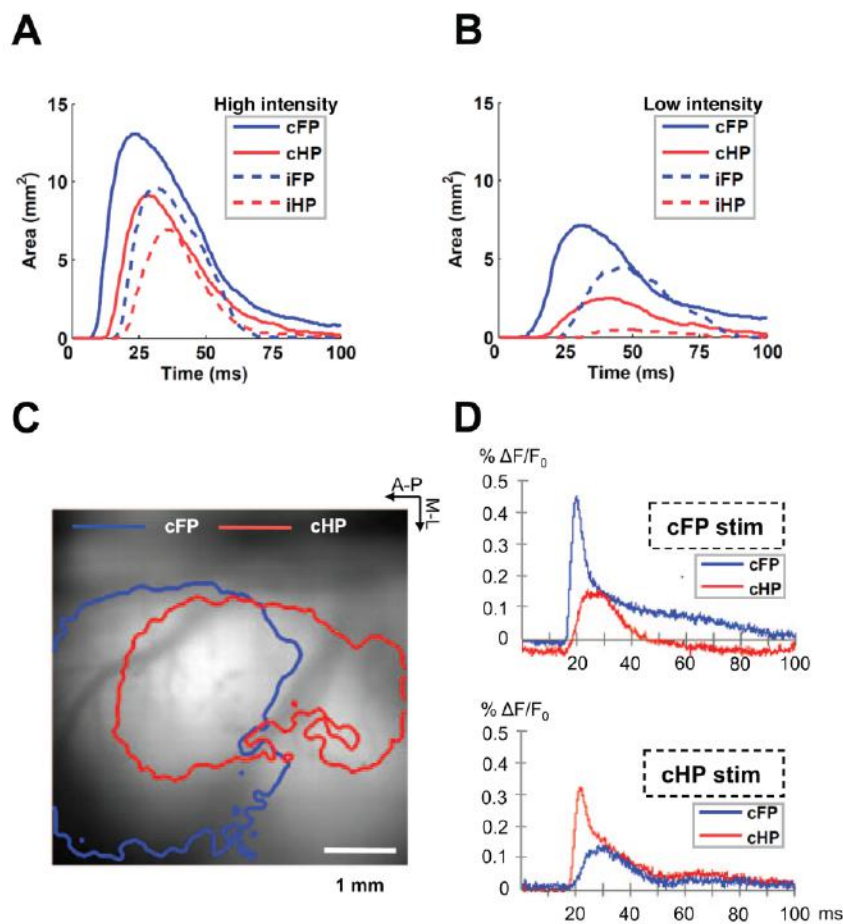


Figure 4. Extent of cortical somatosensory VSD responses. (A,B) Temporal evolution of the activated area in the first 100 ms of the response to stimulation of contralateral forepaw (cFP), contralateral hindpaw (cHP), ipsilateral forepaw (iFP) and ipsilateral hindpaw (iHP) at high-intensity (A) and low-intensity (B). The curves are the average of all animals. The extent of the activation was greater and faster with forepaw compared to hindpaw stimulation and with contralateral compared to ipsilateral stimulation. (C) Cortical overlap between the maximal activated regions by stimulation of contralateral forepaw and hindpaw in a representative animal. The arrows indicate the anterior-posterior and medial-lateral directions. (D) Temporal evolution of the responses in the forepaw focus and in the hindpaw focus evoked by stimulation of both contralateral forepaw (left) and hindpaw (right) in a representative animal. The stimulation of a paw evoked responses not only in the corresponding cortical region but also in the cortical region corresponding to the other paw.
doi:10.1371/journal.pone.0040174.g004

Table 3. Spatio-temporal measures of the extent of cortical somatosensory VSD responses to contralateral stimuli.

| | | HIGH INTENSITY | LOW INTENSITY |
|--|--------------|----------------|---------------|
| Area_{MAX} (mm²) | FP | 14.38 ± 4.91 | 9.04 ± 6.83 |
| | HP | 9.67 ± 4.64 | 3.02 ± 3.23 |
| Latency_{MAX} (ms) | FP | 23.89 ± 5.44 | 34.94 ± 9.25 |
| | HP | 27.67 ± 4.60 | 41.00 ± 7.71 |
| Activation velocity_{MAX} (mm²/ms) | FP | 2.44 ± 0.66 | 1.16 ± 1.00 |
| | HP | 1.30 ± 0.49 | 0.34 ± 0.29 |
| Maximal cortical overlap (mm²) | FP-HP | 7.51 ± 4.44 | 0.52 ± 0.57 |

(FP = forepaw, HP = hindpaw).

doi:10.1371/journal.pone.0040174.t003

Second (and more interesting), while the contralateral stimulation initially activated only one focus, the ipsilateral stimulation activated two foci. One focus, medial to the focus activated by contralateral stimulation, was stereotactically localized in the motor cortex. Interestingly, this focus was activated with a greater amplitude but with a slightly longer latency than the other focus, which was posterior to the focus activated by contralateral stimulation and stereotactically localized in the somatosensory cortex.

Even though we cannot exclude subtle differences in electrode placement between the two sides of the body, it is improbable that they could contribute to the differences between ipsilateral and contralateral responses, because our high-intensity stimuli likely activated almost all fibers ascending through the paws. Furthermore, possible differences in electrode placement cannot justify the presence of two foci in the ipsilateral responses. Spatial differences between ipsilateral and contralateral activations are therefore likely to be due to innervations asymmetries. Indeed, the low level of overlap between the foci activated by contralateral and ipsilateral stimulation is consistent with the low colocalization of responses in the infragranular layers to tactile stimulation of contralateral and ipsilateral forepaw locations [33].

The activation of the somatosensory cortex by stimulation of the contralateral and ipsilateral paws has already been studied using VSD imaging by Ghosh et al. [24] in isoflurane-anesthetized rats. However, that previous work principally reports activation of the motor cortex in response to ipsilateral stimulation – which is indeed consistent with our findings – without observing two foci. It seems unlikely that Ghosh et al. did not report two foci due to the different anesthesia. A more probable explanation could be the lower temporal resolution employed in their study (5 ms) compared to ours (0.5 ms), because of two main reasons: (a) it did not allow for the more subtle spatio-temporal aspects of the cortical activations to be observed and (b) it required them to use much lower stimulus strengths compared to our high-intensity stimuli to avoid saturation of the VSD signals. Overall, the multiple foci of ipsilateral activation reported here complete the picture provided by Ghosh et al. and could be explained by the multiple origins, both cortical [55,32,56] and subcortical [57–59,28], of ipsilateral responses.

Thus, we conclude that there are important differences in the supragranular somatotopic maps that represent the contralateral and ipsilateral paws. In the following sections we will focus on the possible differences in spatial-temporal activation dynamics in response to stimulation of the forepaw and hindpaw.

Extent of Cortical Somatosensory VSD Responses

Forepaw and hindpaw somatosensory stimuli activated large areas of the sensorimotor cortex, well beyond the forepaw and hindpaw somatosensory areas of classical somatotopic maps [34]. From a mechanistic perspective, these extensive activations can be understood by the fact that VSD signals reflect subthreshold activity in the supragranular layers [13]. In these layers, the pyramidal neurons have broad subthreshold receptive fields [60] and long-range horizontal connections [10,61,62].

These extensive activations imply a large overlap between cortical areas activated by forepaw and hindpaw stimuli, consistent with previous electrophysiological observations in the infragranular cortex [48]. Indeed, in our experiments stimulation of the forepaw evoked a supragranular activation of a larger area than that evoked by stimulation of the hindpaw. This result is consistent with the largest representation of the forepaw throughout the somatosensory system [49,63,64], and with recent results obtained with fMRI [53]. Extensive activations and overlaps seen at the level of the entire sensorimotor cortex are directly related to the large receptive fields seen at the single neuron level [48,33], which have been suggested to be important for constructing simple yet sophisticated spatio-temporal codes for somatosensory processing [65,66]. The cortical overlap observed here could also be relevant for forepaw-hindpaw sensorimotor integration.

Not only forepaw stimuli activated larger cortical areas than hindpaw stimuli, but also the activation velocity was greater for forepaw stimuli than for hindpaw stimuli. Consequently, the linear activation velocity was greater from the forepaw cortex to the hindpaw cortex (0.12 mm/ms) than from the hindpaw cortex to the forepaw cortex (0.08 mm/ms). Intriguingly, different activation velocities have been observed within the barrel cortex – with faster activation along the rows compared with the arcs – due to the higher axonal density in the rows [13,14,67]. Consequently, the greater activation velocity from forepaw cortex to hindpaw cortex reported here could suggest certain anatomical anisotropy between the forepaw-to-hindpaw and the hindpaw-to-forepaw directions.

On the one hand, the velocities that we obtained here were somewhat higher than those shown by Petersen et al. [13] in the supragranular layers using VSD imaging of the barrel cortex (<0.06 mm/ms). Based on the lower activation velocities that we obtained with low-intensity stimuli, it is indeed expected for the tactile stimuli used by Petersen et al. [13] to evoke slower activation velocities compared with our high-intensity electrical stimuli. On the other hand, the velocity that we obtained in the supragranular layers was lower than the velocity obtained electrophysiologically in the infragranular layers in response to tactile stimulation of the paws [48]. This coincides with the

CONTRALATERAL

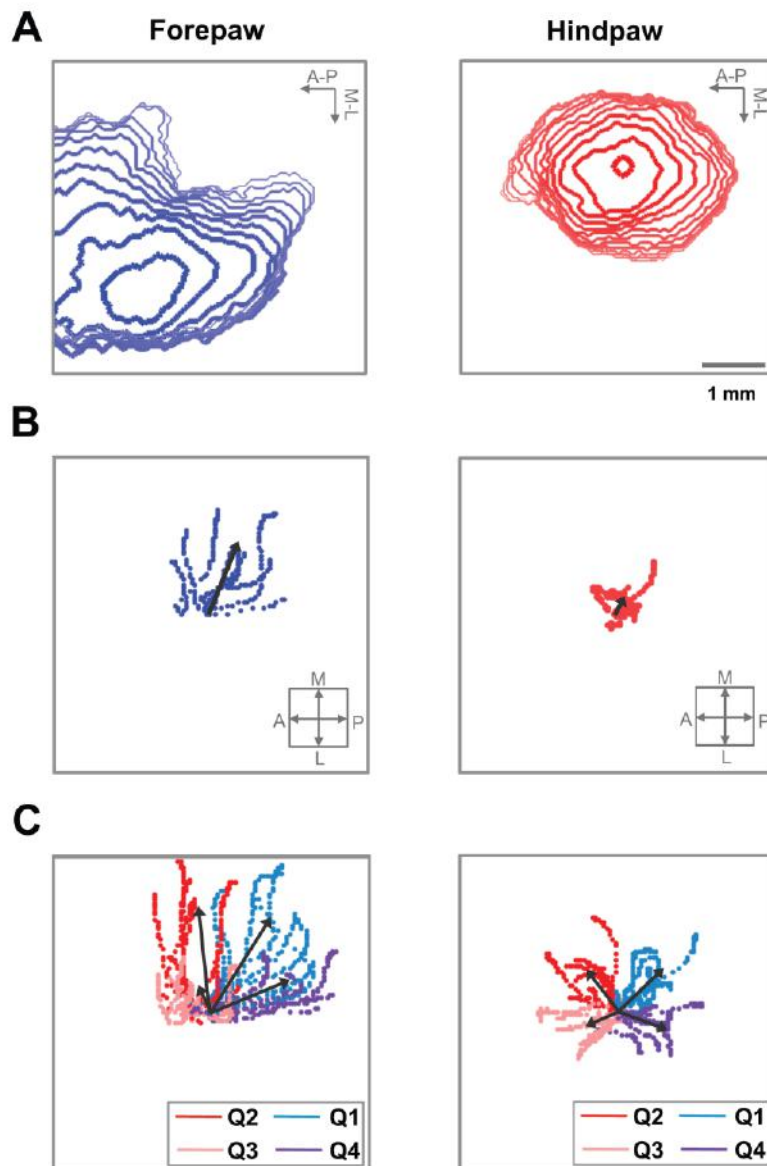


Figure 5. Directionality of cortical somatosensory VSD responses to contralateral stimuli. (A) Contour maps of the temporal evolution of the region activated by stimulation of the contralateral forepaw (left) and hindpaw (right) in a representative animal. The contours are displayed each 1 ms from the initial activation until the activated area reached the maximal value. The arrows indicate the anterior-posterior and medial-lateral directions. (B) Spatio-temporal evolution of the global activation center for forepaw (left) and hindpaw (right) stimuli until the activated area was maximal, in all animals. (C) Spatio-temporal evolution of the activation center in the four quadrants (Q1–Q4) for forepaw (left) and hindpaw (right) stimuli until the activated area was maximal, in all rats. In B,C the initial activation centers corresponding to each rat were aligned and placed in the center of the image and the arrows into the small square indicate the anterior-posterior and medial-lateral directions.
doi:10.1371/journal.pone.0040174.g005

observations of Sakata and Harris [68] regarding the slower expansion velocity in the supragranular layers compared with the infragranular layers. Therefore, we can conclude that the activation velocity of the evoked activity in the supragranular

somatosensory cortex depends on both the location and the intensity of stimulation on the body.

The activity expansion that we observed in the supragranular cortical layers in response to somatosensory stimuli may have two

Table 4. Directionality of cortical somatosensory VSD responses to contralateral stimuli.

| | MEDIAL-LATERAL | | ANTERIOR-POSTERIOR | |
|--------------------------------------|----------------|------------|--------------------|------------|
| | Forepaw | Hindpaw | Forepaw | Hindpaw |
| Global activation center (mm) | 1.17±0.47 | 0.23±0.35 | −0.46±0.67 | −0.10±0.30 |
| Activation center, Q1 (mm) | 1.89±0.69 | 0.80±0.43 | −1.45±0.66 | −0.88±0.34 |
| Activation center, Q2 (mm) | 2.04±0.59 | 0.78±0.42 | 0.48±0.64 | 0.63±0.39 |
| Activation center, Q3 (mm) | 0.37±0.29 | −0.38±0.31 | 0.45±0.69 | 0.72±0.46 |
| Activation center, Q4 (mm) | 0.39±0.33 | −0.38±0.32 | −1.55±0.72 | −0.94±0.29 |

(the values represent the maximal movement of the global activation center and of the activation center in the four quadrants with respect to the initial global activation center. Q1–Q4 corresponds to quadrants 1 to 4 and positive values indicate medial or anterior movement and negative values indicate lateral or posterior movement).

doi:10.1371/journal.pone.0040174.t004

possible non-mutually excluding origins: subcortical and cortico-cortical. On the one hand, the subcortical origin is quite important under our experimental conditions: at thalamic level somatosensory stimuli, in addition to the principal receptive field, also activate numerous secondary receptive fields with slightly higher latencies [47,69]. This would contribute to the rapid expansion of the activity observed at the cortical level. On the other hand, the cortico-cortical origin may have several contributions, as horizontal connections exist both in the input layer 4 [10,70], in the supragranular layers 2/3 [10,61,62] and in the infragranular layers 5/6 [2,71]. If propagation of cortical activity occurs in one layer, it rapidly extends to the other layers through columnar projections [13,72,73].

Whatever the exact mechanism, any contribution to this activity expansion should be a relatively fast event, as the cortical activation reached its maximum extension about 25–30 ms after the stimulus in our experiments. These short latencies clarify that the activations reported here specifically refer to the classical short-latency components of somatosensory responses and not to the long-latency activations that are typically due to the propagation of up-states triggered by the stimuli [51].

Directionality of Cortical Somatosensory VSD Responses

Stimulation of the forepaw and hindpaw evoked different cortical activation dynamics.

These dynamics had a clear medial directionality in response to forepaw stimulation but were much more uniform in all directions in response to hindpaw stimulation. These observations represent the functional counterpart of the known anatomical projections from the somatosensory to the motor cortex [17,37–41]. Within the sensorimotor cortex, the barrel cortex displays the maximal separation between sensory and motor [36], and somatosensory stimuli first activate the somatosensory cortex and then the motor cortex [17,40]. Similarly, the forepaw somatosensory cortex is mostly separated from the corresponding region of the motor cortex [35,36], explaining the large propagation in the medial direction in response to forepaw stimuli in our results. Conversely, the hindpaw somatosensory cortex mostly overlaps with the corresponding region of the motor cortex [35,36], explaining the uniform propagation in all directions in our results. The overall directionality of cortical VSD responses thus appears to reflect the general preference of somatosensory-evoked activity to propagate from the somatosensory cortex to the corresponding motor cortex.

The different spatio-temporal dynamics of activation between forepaw and hindpaw stimuli could be related to the different functional roles of the paws: the forepaw is more active than the hindpaw in object recognition and knowledge of the outside world

[74,75]. Integrating our observation with previous results in the barrel cortex, it is therefore tempting to speculate that a lower level of overlap between the somatosensory and motor cortex could be necessary for more sophisticated sensorimotor integration. Overall, the activation flow from the somatosensory cortex to the motor cortex could offer the functional substrate for an intriguing “cortical reflex” that could be relevant for sensorimotor control.

Possible Relevance for Studying Cortical Reorganization

VSD imaging of the paw region of the sensorimotor cortex has been recently used as a tool to investigate cortical reorganization after stroke and after spinal cord injury. On the one hand, stroke in the forelimb somatosensory cortex in mice decreases or eliminates the VSD responses in the affected forelimb area, while altering both the VSD responses in adjacent areas (motor forelimb and hindlimb cortex) [21,22] and the VSD responses evoked in the hemisphere opposite to the stroke [23]. On the other hand, thoracic spinal cord injury in rats decreases (or eliminates in case of complete lesion) the VSD responses to stimuli delivered to the hindpaw [24,26], while it increases the activated area to stimuli delivered to the forepaw, leading to a classical expansion of the forelimb cortex into the hindlimb cortex [25]. It is likely that more subtle VSD measures could allow more subtle aspects of cortical reorganization to be uncovered. The novel results reported here – particularly the two ipsilateral foci and the different directionality of cortical propagation between the forepaw cortex and the hindpaw cortex – could, therefore, be helpful to fully understand not only the physiological organization of the rat sensorimotor cortex, but also its reorganization in pathological conditions such as stroke and spinal cord injury.

In conclusion, this work offers a complete spatio-temporal map of the supragranular cortical VSD activation in response to stimulation of the paws, showing important somatotopic differences between contralateral and ipsilateral maps as well as differences in the spatio-temporal activation dynamics in response to forepaw and hindpaw stimuli.

Materials and Methods

Surgical Procedures and Dye Staining

All animal experiments described here were performed following the rules of the International Council for Laboratory Animal Science, European Union regulation 2010/63/EU, and were approved by the Ethical Committee for Animal Research of the Hospital Nacional de Paraplégicos (Toledo, Spain). Wistar rats between 280–410 g were anesthetized with urethane (1.0–1.5 g/Kg) applied intraperitoneally. During the experiment, the

IPSilATERAL

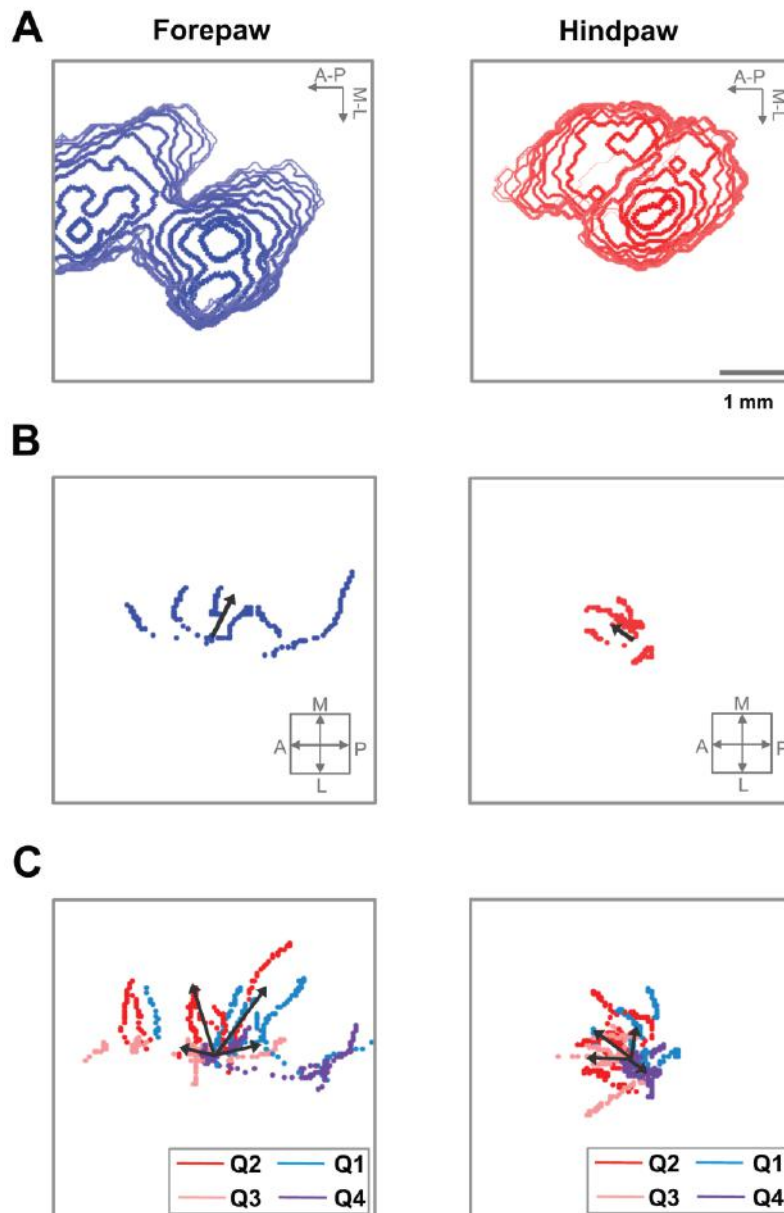


Figure 6. Directionality of cortical somatosensory VSD responses to ipsilateral stimuli. (A) Contour maps of the temporal evolution of the region activated by stimulation of the ipsilateral forepaw (left) and hindpaw (right) in a representative animal. (B) Spatio-temporal evolution of the global activation center for forepaw (left) and hindpaw (right) stimuli until the activated area was maximal, in all animals. (C) Spatio-temporal evolution of the activation center in the four quadrants (Q1–Q4) for forepaw (left) and hindpaw (right) stimuli until the activated area was maximal, in all rats. doi:10.1371/journal.pone.0040174.g006

anesthesia level was regularly monitored by tail-pinch reflex and additional urethane (<20% of original doses) was applied when the reflex appeared. Once the anesthesia had taken complete

effect, animals were placed in a stereotaxic frame (SR-6R; Narishige Scientific Instruments, Tokyo, Japan). Lidocaine 2% was applied over body surfaces in contact with the frame and over

the incision area. During the experiment, the temperature of animals was kept constant at 36 °C by means of an automatically controlled heating pad. A large craniotomy was performed above the forepaw and hindpaw regions of the primary somatosensory cortex in the left hemisphere (AP = 2; -4; L = 1.5). Extreme care was taken during craniotomy to maintain the dura intact. In order to decrease the curvature of the cortex due to intracranial pressure, the cisterna magna was opened. Moreover, in order to guarantee that the overall cortical region to be imaged was in the same focal plane, the stereotaxic frame was tilted about 10 degrees. The voltage-sensitive dye RH1691 [11,14] was dissolved at 2 mg/ml in buffer solution containing (in mM): 126 NaCl, 3.53 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 26 NaHCO₃, 1 MgSO₄·7H₂O, 10 dextrose, 1000 CaCl₂. To stain the cortex, the resulting dye solution was topically applied on the craniotomy region and allowed to diffuse in the cortex for 2 h. The craniotomy region was delimited with agar to avoid spilling of the dye solution. After staining, the cortex was washed for 20 min to remove unbound dye. Then, the cortex was covered with 1% agar dissolved in buffer solution and a glass coverslip was placed on top in order to stabilize the cortex [43].

Imaging VSD Signals

To image the VSD signals, we used light from a 150 W halogen lamp controlled by an electromagnetic shutter (MHAB-150W, MORITEX). The light was band-pass filtered at 632 nm (excitation filter FF01-632/22-25) and reflected toward the cortex by a 650 nm dichroic mirror (FF650-Di01, reflection: 500–640 nm, transmission: 660–825 nm) to excite the dye. The light emitted by the dye from the cortex, after being transmitted without change through the dichroic mirror, was long pass filtered at 665 nm (emission filter RG-665) and finally imaged using a MICAM ULTIMA-L system (BrainVision Inc.). The rationale for this standard VSD recording configuration is that the excitation filter, the dichroic mirror and the emission filter are designed to separate and optimize the excitation fluorescence (smaller wavelength) and the emission fluorescence (larger wavelength) of the RH1691 dye, thereby maximizing the signal-to-noise ratio of the VSD recording. A representative diagram of the experimental setup is showed in Fig. 1.

The camera captures images with 100×100 pixels and the size of the imaged cortical area was 5-mm×5-mm, thus each pixel imaged an area of 50-μm×50-μm. The images were captured with a temporal resolution of 0.5 ms. Non-stimulated sweeps were subtracted to stimulated sweeps in order to minimize the bleaching artifact [45]. In stimulated sweeps, the recording was performed between 250 ms before to 250 ms after the stimulus.

Electrical Stimulation of the Paws

We used VSD imaging to study the cortical activation evoked by electrical stimulation of the paws. Square-pulse electrical stimuli were generated using a digital stimulator (DS8000) with an ISO-Flex stimulus isolator (A.M.P.I.). Electrical pulses were applied using bipolar needle electrodes located subcutaneously in the wrist of the forepaws and of the hindpaws, one pole on each side of the corresponding paw. The stimulation protocol consisted of a sequence of 30 square-pulses of 2 ms duration and 0.05 Hz frequency. We employed this low frequency of stimulation in order to minimize phototoxicity [12,14]. We separately applied this stimulation protocol to the four paws, first using low-intensity stimuli (0.6 mA) and then using high-intensity stimuli (6 mA). Low-intensity stimuli were intended to activate only a fraction of the available fibers, mainly low-threshold primary fibers running through the lemniscal pathway, from the dorsal columns to the

brainstem [54,76,77]. High-intensity stimuli were intended to activate the maximum number of fibers, including high-threshold primary fibers that make synapse in the dorsal horns of the spinal cord, in turn activating the spinothalamic tract [54,76,77]. The responses to high-intensity electrical stimuli are more sensitive than the responses to low-intensity electrical or tactile stimuli for investigating cortical reorganization after spinal cord injury [25,51,78–81]. Note that we could use much higher stimulus strengths compared to previous VSD forepaw/hindpaw studies [24,25] without saturating the VSD signal, thank to the higher temporal resolution of our acquisition (0.5 ms/frame compared to 5 ms/frame). High-intensity stimuli caused muscle contraction, whereas low-intensity stimuli did not. Muscle contraction corresponds to the m-wave and/or the h-reflex, which in the rat occur between about 1 ms and 10 ms after nerve stimulation [82]. This means that within 10 ms after our high-intensity stimuli the animal received a second somatosensory input due to the muscle contraction. However, it is unlikely that this second input could contribute to our cortical responses due to its much lower intensity and to the strong synaptic depression that occurs for inter-stimulus intervals below 25 ms in the somatosensory system of anesthetized rats [83].

In this study, we used a total of 11 rats: 9 of 11 rats with contralateral stimulation at low intensity, 9 of 11 rats with contralateral stimulation at high intensity and 6 of 11 rats with ipsilateral stimulation.

Data Analysis

We performed the analysis in a temporal window of 50 ms before the stimulus (background window) and a temporal window of 100 ms after the stimulus (response window) with a temporal resolution of 0.5 ms. To improve the signal-to-noise ratio, we took the average of 30 sweeps and then applied a temporal filter (low pass filter: 200 Hz) and spatial filter (Gaussian low pass filter: #rows = 3, #columns = 3, sigma = 1).

To define the cortical activated region in each temporal instant, we considered the following criteria: the signal value in each pixel must be (1) larger than the mean plus five times the standard deviation of the signal within the background window and (2) at least half the minor of the maximal signal value evoked by different stimuli (in different paws and with different intensities) in any pixel within the response window. The pixels that did not verify the anterior conditions were considered non-activated (value = 0). The conditions for which a pixel was considered activated can be expressed as the following:

$$S^*(i,j,t) = \begin{cases} S(i,j,t) & \text{if } S(i,j,t) > \bar{S}_B(i,j) + 5 * \sigma_B(i,j) \text{ and} \\ & S(i,j,t) \geq 0.5 * \min[\{\max(S_{Sim1}(i,j,t)) \\ & \max(S_{Sim2}(i,j,t)) \dots\}] \\ 0 & \text{otherwise} \end{cases}$$

$$\bar{S}_B(i,j) = \frac{\sum_t S_B(i,j,t)}{n_B} \quad \sigma_B(i,j) = \left[\frac{\sum_t (S_B(i,j,t) - \bar{S}_B(i,j))^2}{n_B - 1} \right]^{1/2} \quad (1)$$

where $S(i,j,t)$ is the initial signal value of the pixel (i,j) with $i, j = 1, 2, \dots, 100$ at the instant t in the response window, and $S^*(i,j,t)$

is the signal value assigned to the pixel (i, j) at the instant t ; $S_B(i, j, t')$ is the signal value of the pixel (i, j) at the instant t' in the background window; $\bar{S}_B(i, j)$ is the mean signal value of the pixel (i, j) in the background window; $\sigma_B(i, j)$ is the standard deviation of the signal in the pixel (i, j) in the background window; n_B is the number of time points in the background window (100); and $\{\max(S_{stim1}(i, j, t)) \max(S_{stim2}(i, j, t)) \dots\}$ are the maximal signal values for any pixel and any instant in the response windows for the different types of stimuli.

First, we performed an analysis of the VSD response amplitudes and VSD response latencies, which allowed us to compare our VSD results with classical electrophysiological data. Next, making use of the spatio-temporal resolution provided by VSD imaging, we defined several measures to quantify the spatio-temporal dynamics of the cortical activity evoked by the stimuli. The images were exported to Matlab (version 7.1; The Mathworks) for data analysis.

Amplitudes and latencies of the cortical somatosensory VSD responses. To study the supragranular cortical VSD responses, we defined the initial response latency, L_s , as the first temporal instant after the stimulus at which there was at least one activated pixel (activated region larger than zero) (Eq. (2)). Among those initially activated pixels, the response amplitude, Amp , was defined as the maximal signal value within the response window (Eq. (3)), and the temporal instant in which the signal reached this maximal value was defined as the peak latency, L_P (Eq. (4)).

$$L = t_0 \text{ such that } S^*(i, j, t < t_0) = 0 \quad \forall (i, j) \text{ and} \\ \exists (i, j) \text{ such that } S^*(i, j, t_0) \neq 0 \quad (2)$$

$$Amp = \max(S^*(i, j, t)) \text{ with } (i, j) \text{ such that } S^*(i, j, L) \neq 0 \quad (3)$$

$$L_P = t_P \text{ such that } S^*(i, j, t_P) = Amp \quad (4)$$

Initial activation maps were obtained as the first contour (1 ms) from the contour maps of the temporal evolution of the activated region (see *The directionality of cortical somatosensory responses*, below).

The extent of cortical somatosensory VSD responses. To quantify the spatial extent of the cortical activation evoked by somatosensory stimuli, we calculated the area of the activated region. For each instant of the response window, the area $A(t)$ was determined as the number of activated pixels multiplied by the pixel dimension ($DimPixel = 0.0025 \text{ mm}^2$) (Eq. (5)). To study the velocity at which the activation spread over the cortex, or the activation velocity $V(t)$, we calculated the derivative of the area with respect to the response-window time (Eq. (6)). This activation velocity was measured as mm^2/ms .

$$A(t) = DimPixel \cdot \sum_{i,j} (p_A(i, j, t) > 0) \quad \text{where} \\ p_A(i, j, t) = \begin{cases} 1 & \text{if } S^*(i, j, t) \neq 0 \\ 0 & \text{otherwise} \end{cases} \quad (5)$$

$$V(t) = \frac{A(t) - A(t-r)}{r} \quad (6)$$

where r is the temporal resolution (0.5 ms).

Due to the large extent of the cortex that can respond to a somatosensory stimulus, it is likely that a stimulus delivered to a paw evokes a response in the region of the cortex corresponding to another paw [48]. To investigate the possible cortical overlap between the regions activated by stimulation of forepaw and hindpaw, we determined the maximal cortical overlap, Ω , which was calculated as the number of pixels activated by both forepaw and hindpaw stimuli – multiplied by the pixel dimension – in the temporal instant at which the activated area was maximal (Eq. (7)).

$$\Omega = DimPixel \cdot \sum_{i,j} (p_{\Omega}(i, j) > 0) \quad (7)$$

$$\text{where } p_{\Omega}(i, j) = \begin{cases} 1 & \text{if } S_{FP}^*(i, j, t_{FP}) \neq 0 \text{ and } S_{HP}^*(i, j, t_{HP}) \neq 0 \\ 0 & \text{otherwise} \end{cases}$$

with t_{FP} such that $A_{FP}(t_{FP}) = \max(A_{FP}(t))$ and t_{HP} such that $A_{HP}(t_{HP}) = \max(A_{HP}(t))$ where $S_{FP}^*(i, j, t_{FP})$ and $S_{HP}^*(i, j, t_{HP})$ are the signal values assigned to the pixel (i, j) when we stimulated the forepaw or hindpaw, respectively.

We further calculated the response amplitude and response latency in the cortical region corresponding to the non-stimulated paw, i.e., the hindpaw cortex when we stimulated the forepaw or the forepaw cortex when we stimulated the hindpaw (i.e. the VSD equivalent of the “non-homologous responses” described in [48]). The response amplitude and response latency were calculated at the same point in which we calculated the amplitude when we stimulated the optimal paw. We also calculated the linear activation velocity from forepaw to hindpaw cortex and the linear activation velocity from hindpaw to forepaw cortex. This velocity was calculated as the distance between forepaw and hindpaw cortex divided by the latency difference between the response in forepaw and hindpaw cortex.

The directionality of cortical somatosensory responses. To investigate the possible directionality in the cortical activation dynamics, we first constructed contour maps of the temporal evolution of the activated region. The contours were represented every 1 ms from the instant of initial activation until the instant at which the activated area reached the maximal value. Each contour included all pixels that, at the corresponding time instant, exhibited an intensity greater than a fixed threshold (50% of the maximum intensity among all pixels within the response window). To reduce spatial noise for illustration purposes, regions of less than 10 activated pixels were omitted, and spatial filtering was applied (matlab function ‘imdilute’ with a disk-shape of 2-pixels radius).

To quantitatively study the directionality, we analyzed the spatio-temporal evolution of the center of the activated region (global activation center) from the beginning of the activation until the activated area reached the maximal value. For each temporal instant, the I and J coordinates of the global activation center were calculated with the same relationship as that for the calculation of a mass center (Eq. (8)).

$$I(t) = \frac{\sum_i j \cdot \sum_j S(i, j, t)}{\sum_i \sum_j S(i, j, t)} \quad J(t) = \frac{\sum_j i \cdot \sum_i S(i, j, t)}{\sum_i \sum_j S(i, j, t)} \quad i, j = 1, 2, \dots, 100 \quad (8)$$

To study the non-uniformity of the spread direction of the activation, we extended the calculation of the global activation

center to the calculation of the activation center in each of the four quadrants of a coordinate system in which the origin was the global activation center in each temporal instant. For each instant t , the calculation of the \bar{i} and \bar{j} coordinates of the activation center in each quadrant was performed according to the following relationships:

$$\bar{i}(t) = \frac{\sum_{i=\text{range}I} \sum_{j=\text{range}J} S^*(i,j,t)}{\sum_{i=\text{range}I} \sum_{j=\text{range}J} S^*(i,j,t)} \quad \bar{j}(t) = \frac{\sum_{j=\text{range}J} \sum_{i=\text{range}I} S^*(i,j,t)}{\sum_{j=\text{range}J} \sum_{i=\text{range}I} S^*(i,j,t)} \quad (9)$$

$\text{range}I = \begin{cases} i \geq I(t) & \text{quadrant 1 and 4} \\ i < I(t) & \text{quadrant 2 and 3} \end{cases}$
 $\text{range}J = \begin{cases} j \geq J(t) & \text{quadrant 1 and 2} \\ j < J(t) & \text{quadrant 3 and 4} \end{cases}$ where $I(t)$, $J(t)$ are the coordinates of the global activation center and were calculated with Eq. (8).

Statistical analyses. To compare the response amplitude and response latency to stimulation of the contralateral forepaw and hindpaw at low and high intensity, we employed a two-way mixed analysis of variance (ANOVA), where the paw was the first factor with two levels of repeated measures (forepaw and hindpaw), and the stimulation intensity was the second factor with two levels of independent measures (low and high intensity). The reason for the independent measures was because not all rats received both low- and high-intensity stimuli. To compare the response amplitude and response latency to stimulation of ipsilateral and contralateral paws, we used a two-way independent measures ANOVA, where the paw was the first factor with two levels (forepaw and hindpaw), and the body side was the second factor with two levels (contralateral and ipsilateral). This comparison was performed only with response to high-intensity stimuli because ipsilateral responses to low-intensity stimuli were not easily detected.

To evaluate the extent of the cortical somatosensory responses, we compared the maximal activated area and the maximal

activation velocity of the responses to stimulation of the contralateral forepaw and hindpaw at high and low intensities. This comparison was performed with a two-way mixed ANOVA, where the paw was the first factor with two levels of repeated measures (forepaw and hindpaw), and the stimulation intensity was the second factor with two levels of independent measures (high and low intensity). We compared the overlap between the maximal activated area for stimulation of the contralateral forepaw and hindpaw at high and low intensity using an unpaired t -test. The response amplitude and response latency in the cortical region corresponding to the stimulated paw (contralateral forepaw or hindpaw) were compared with the responses in the cortical region corresponding to the non-stimulated paw (contralateral hindpaw or forepaw) using a paired t -test. This comparison was performed only with responses to high-intensity stimuli because the responses in the cortical region corresponding to the non-stimulated paw were much less observable at low intensity. The linear activation velocity from the forepaw cortex to the hindpaw cortex was compared with the linear activation velocity from the hindpaw cortex to the forepaw cortex using an unpaired t -test.

To study the directionality of the cortical somatosensory responses, we determined if there was movement of the global activation center by comparing the coordinates of the global activation center when the area reached the maximal value with the initial coordinates using a paired t -test. This was separately performed for the medial-lateral and anterior-posterior directions for both the contralateral response of forepaw and hindpaw cortex to high-intensity stimulation.

All data were log-transformed for statistical analysis. All results are given as mean \pm standard deviation and were considered significant at $p < 0.05$.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JA GF. Performed the experiments: MLM. Analyzed the data: MLM. Wrote the paper: MLM JA GF.

References

1. Castro-Alamancos MA, Connors BW (1997) Thalamocortical synapses. *Prog Neurobiol* 51: 581–606.
2. Maimon ID, Sakmann B, Brecht M (2004) Sub- and suprathreshold receptive field properties of pyramidal neurons in layers 5A and 5B of rat somatosensory barrel cortex. *J Physiol* 556: 601–622.
3. Lam YW, Sherman SM (2010) Functional organization of the somatosensory cortical layer 6 feedback to the thalamus. *Cerebral Cortex* 20: 13–24.
4. Sherman SM, Guillery RW (1996) Functional organization of thalamocortical relays. *J Neurophysiol* 76: 1367–1395.
5. Lübke J, Egger V, Sakmann B, Feldmeyer D (2000) Columnar organization of dendrites and axons of single and synaptically coupled excitatory spiny neurons in layer 4 of the rat barrel cortex. *J Neurosci* 20: 5300–5311.
6. Petersen CC, Sakmann B (2001) Functionally independent columns of rat somatosensory barrel cortex revealed with voltage-sensitive dye imaging. *J Neurosci* 21: 8435–8446.
7. Higley MJ, Contreras D (2007) Cellular mechanisms of suppressive interactions between somatosensory responses in vivo. *J Neurophysiol* 97: 647–658.
8. Kleinfeld D, Delaney KR (1996) Distributed representation of vibrissa movement in the upper layers of somatosensory cortex revealed with voltage-sensitive dyes. *J Comp Neurol* 375: 89–108.
9. Chakrabarti S, Alloway KD (2006) Differential Origin of Projections from SI Barrel Cortex to the Whisker Representations in SII and MII. *Comp Gen Pharmacol* 636: 624–636.
10. Frostig RD, Xiong Y, Chen-Bee CH, Kvavinskii E, Stehberg J (2003) Large-scale organization of rat sensorimotor cortex based on a motif of large activation spreads. *J Neurosci* 23: 13274–13284.
11. Shoham D, Glaser DE, Arieli A, Kenet T, Wijnbergen C, et al. (1999) Imaging cortical dynamics at high spatial and temporal resolution with novel blue voltage-sensitive dyes. *Neuron* 24: 791–802.
12. Grinvald A, Hildesheim R (2004) VSDI: a new era in functional imaging of cortical dynamics. *Nat Rev Neurosci* 5: 874–885.
13. Petersen CCH, Grinvald A, Sakmann B (2003) Spatiotemporal dynamics of sensory responses in layer 2/3 of rat barrel cortex measured in vivo by voltage-sensitive dye imaging combined with whole-cell voltage recordings and neuron reconstructions. *J Neurosci* 23: 1298–1309.
14. Derdikman D, Hildesheim R, Ahissar E, Arieli A, Grinvald A (2003) Imaging spatiotemporal dynamics of surround inhibition in the barrels somatosensory cortex. *J Neurosci* 23: 3100–3105.
15. Civillico EF, Contreras D (2006) Integration of evoked responses in supragranular cortex studied with optical recordings in vivo. *J Neurophysiol* 96: 336–351.
16. Ferezou I, Bolea S, Petersen CCH (2006) Visualizing the cortical representation of whisker touch: voltage-sensitive dye imaging in freely moving mice. *Neuron* 50: 617–629.
17. Ferezou I, Haiss F, Gentet LJ, Aronoff R, Weber B, et al. (2007) Spatiotemporal dynamics of cortical sensorimotor integration in behaving mice. *Neuron* 56: 907–923.
18. Devonshire IM, Grandy TH, Dommett EJ, Greenfield SA (2010) Effects of urethane anaesthesia on sensory processing in the rat barrel cortex revealed by combined optical imaging and electrophysiology. *Eur J Neurosci* 32: 786–797.
19. Tsytsarev V, Pope D, Pumbao E, Yablonskii A, Hofmann M (2010) Study of the cortical representation of whisker directional deflection using voltage-sensitive dye optical imaging. *Neuroimage* 53: 233–238.
20. Mayas F, Sreenivasan V, Marbach F, Wacongne C, Barse B, et al. (2010) Motor control by sensory cortex. *Science* 330: 1240–1243.
21. Brown CE, Aminoltejeri K, Erb H, Winship IR, Murphy TH (2009) In vivo voltage-sensitive dye imaging in adult mice reveals that somatosensory maps lost to stroke are replaced over weeks by new structural and functional circuits with prolonged modes of activation within both the peri-infarct zone and distant sites. *J Neurosci* 29: 1719–1734.

22. Sigler A, Mohajerani MH, Murphy TH (2009) Imaging rapid redistribution of sensory-evoked depolarization through existing cortical pathways after targeted stroke in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 11759–11764.
23. Mohajerani M, Aminoltejeri K, Murphy T (2011) Targeted mini-strokes produce changes in interhemispheric sensory signal processing that are indicative of disinhibition within minutes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 183–191.
24. Ghosh A, Sydekum E, Hais F, Peduzzi S, Zorner B, et al. (2009) Functional and anatomical reorganization of the sensory-motor cortex after incomplete spinal cord injury in adult rats. *J Neurosci* 29: 12210–12219.
25. Ghosh A, Hais F, Sydekum E, Schneider R, Gullo M, et al. (2010) Rewiring of hindlimb corticospinal neurons after spinal cord injury. *Nat Neurosci* 13: 97–104.
26. Lee KH, Kim UJ, Park YG, Won R, Lee H, et al. (2011) Optical imaging of somatosensory evoked potentials in the rat cerebral cortex after spinal cord injury. *J Neurotrauma* 28: 797–807.
27. Erzurumlu RS, Killackey HP (1980) Diencephalic projections of the subnucleus interpolaris of the brainstem trigeminal complex in the rat. *Neuroscience* 5: 1891–1901.
28. Wree A, Izev DE, Schmitt O, Usunoff KG (2005) Neurons in the dorsal column nuclei of the rat emit a moderate projection to the ipsilateral ventrobasal thalamus. *Anat Embryol* 210: 155–162.
29. Wise SP, Jones EG (1976) The organization and postnatal development of the commissural projection of the rat somatic sensory cortex. *J Comp Neurol* 158: 313–343.
30. Killackey HP, Belford GR (1979) The formation of afferent patterns in the somatosensory cortex of the neonatal rat. *J Comp Neurol* 183: 285–303.
31. Olavarria J, Van Shuyters RC, Killackey HP (1984) Evidence for the complementary organization of callosal and thalamic connections within rat somatosensory cortex. *Brain Res* 291: 364–368.
32. Shuler MG, Krupa DJ, Nicolelis MA (2001) Bilateral integration of whisker information in the primary somatosensory cortex of rats. *J Neurosci* 21: 5251–5261.
33. Tutunculer B, Foffani G, Himes BT, Moxon KA (2006) Structure of the excitatory receptive fields of infragranular forelimb neurons in the rat primary somatosensory cortex responding to touch. *Cerebral Cortex* 16: 791–810.
34. Chapin JK, Lin CS (1984) Mapping the body representation in the SI cortex of anesthetized and awake rats. *J Comp Neurol* 229: 199–213.
35. Donoghue JP, Kernan KL, Ebner FF (1979) Evidence for two organizational plans within the somatic sensory-motor cortex of the rat. *J Comp Neurol* 183: 647–663.
36. Neafsey EJ, Bold EL, Haas G, Hurley-Gius KM, Quirk G, et al. (1986) The organization of the rat motor cortex: a microstimulation mapping study. *Brain Res* 396: 77–96.
37. Farkas T, Kis Zs, Toldi J, Wolff JR (1999) Activation of the primary motor cortex by somatosensory stimulation in adult rats is mediated mainly by associational connections from the somatosensory cortex. *Neuroscience* 90: 353–361.
38. Petersen CCH (2007) The functional organization of the barrel cortex. *Neuron* 56: 339–355.
39. Colechio EM, Alloway KD (2009) Differential topography of the bilateral cortical projections to the whisker and forepaw regions in rat motor cortex. *Brain Struct Funct* 213: 423–439.
40. Mao T, Kusefoglu D, Hooks BM, Huber D, Petreanu L, et al. (2011) Long-range neuronal circuits underlying the interaction between sensory and motor cortex. *Neuron* 72: 111–123.
41. Rocco-Donovan M, Ramos RL, Giraldo S, Brumberg JC (2011) Characteristics of synaptic connections between rodent primary somatosensory and motor cortices. *Somatosens Mot Res* 28: 63–72.
42. Cohen LB, Salzberg BM, Davila HV, Ross WN, Landowne D, et al. (1974) Changes in axon fluorescence during activity: molecular probes of membrane potential. *J Membr Biol* 19: 1–36.
43. Lippert MT, Takagaki K, Xu W, Huang X, Wu JY (2007) Methods for voltage-sensitive dye imaging of rat cortical activity with high signal-to-noise ratio. *J Neurophysiol* 98: 502–512.
44. Chemla S, Chavane F (2010) A biophysical cortical column model to study the multi-component origin of the VSDI signal. *Neuroimage* 53: 420–438.
45. Berger T, Borgdorff A, Crochet S, Neubauer FB, Lefort S, et al. (2007) Combined voltage and calcium epifluorescence imaging in vitro and in vivo reveals subthreshold and suprathreshold dynamics of mouse barrel cortex. *J Neurophysiol* 97: 3751–3762.
46. Contreras D, Llinas R (2001) Voltage-sensitive dye imaging of neocortical spatiotemporal dynamics to afferent activation frequency. *J Neurosci* 21: 9403–9413.
47. Aguilar J, Morales-Botello ML, Foffani G (2008) Tactile responses of hindpaw, forepaw and whisker neurons in the thalamic ventrobasal complex of anesthetized rats. *Eur J Neurosci* 27: 378–387.
48. Moxon KA, Hale LL, Aguilar J, Foffani G (2008) Responses of infragranular neurons in the rat primary somatosensory cortex to forepaw and hindpaw tactile stimuli. *Neuroscience* 156: 1083–1092.
49. Bermejo PE, Jiménez CE, Torres GV, Avendaño C (2003) Quantitative stereological evaluation of the gracile and cuneate nuclei and their projection neurons in the rat. *J Comp Neurol* 463: 419–433.
50. Chapin JK, Sadeq M, Guise JL (1987) Corticocortical connections within the primary somatosensory cortex of the rat. *J Comp Neurol* 263: 326–346.
51. Aguilar J, Humanes-Valera D, Alonso-Calviño E, Yague JG, Moxon KA, et al. (2010) Spinal cord injury immediately changes the state of the brain. *J Neurosci* 30: 7528–7537.
52. Gochin PM, Bedenbaugh P, Gelfand JJ, Gross CG, Gerstein GL (1992) Intrinsic signal optical imaging in the forepaw area of rat somatosensory cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 8381–8383.
53. Goloshevsky AG, Wu CW-H, Dodd SJ, Koretsky AP (2011) Mapping cortical representations of the rodent forepaw and hindpaw with BOLD fMRI reveals two spatial boundaries. *Neuroimage* 57: 526–538.
54. Yague JG, Foffani G, Aguilar J (2011) Cortical hyperexcitability in response to preserved spinothalamic inputs immediately after spinal cord hemisection. *Exp Neurol* 227: 252–263.
55. Manzoni T, Barbaresi P, Bellardinelli E, Caminiti R (1980) Callosal projections from the two body midlines. *Exp Brain Res* 39: 1–9.
56. Pelled G, Chuang K-H, Dodd SJ, Koretsky AP (2007) Functional MRI detection of bilateral cortical reorganization in the rodent brain following peripheral nerve deafferentation. *Neuroimage* 37: 262–273.
57. Armstrong-James M, George MJ (1988) Bilateral receptive fields of cells in rat SmI cortex. *Exp Brain Res* 70: 155–165.
58. Burstein R, Dado RJ, Giesler GJ (1990) The cells of origin of the spinothalamic tract of the rat: a quantitative reexamination. *Brain Res* 511: 329–337.
59. Usunoff KG, Kharazia VN, Valschanoff JG, Schmidt HH, Weinberg RJ (1999) Nitric oxide synthase-containing projections to the ventrobasal thalamus in the rat. *Anat Embryol* 200: 265–281.
60. Brecht M, Roth A, Sakmann B (2003) Dynamic receptive fields of reconstructed pyramidal cells in layers 3 and 2 of rat somatosensory barrel cortex. *J Physiol* 553: 243–265.
61. Bernardo KL, McCasland JS, Woolsey TA, Strominger RN (1990) Local intra- and interlaminar connections in mouse barrel cortex. *J Comp Neurol* 291: 231–255.
62. Armstrong-James M, Fox K, Das-Gupta A (1992) Flow of excitation within rat barrel cortex on striking a single vibrissa. *J Neurophysiol* 68: 1345–1358.
63. Dawson DR, Killackey HP (1987) The organization and mutability of the forepaw and hindpaw representations in the somatosensory cortex of the neonatal rat. *J Comp Neurol* 256: 246–256.
64. Francis JT, Xu S, Chapin JK (2008) Proprioceptive and cutaneous representations in the rat ventral posterolateral thalamus. *J Neurophysiol* 99: 2291–2304.
65. Foffani G, Chapin JK, Moxon KA (2008) Computational role of large receptive fields in the primary somatosensory cortex. *J Neurophysiol* 100: 268–280.
66. Foffani G, Morales-Botello ML, Aguilar J (2009) Spike timing, spike count, and temporal information for the discrimination of tactile stimuli in the rat ventrobasal complex. *J Neurosci* 29: 5964–5973.
67. Petersen CCH, Hahn TTG, Mehta M, Grünvald A, Sakmann B (2003) Interaction of sensory responses with spontaneous depolarization in layer 2/3 barrel cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 13638–13643.
68. Sakata S, Harris KD (2009) Laminar structure of spontaneous and sensory-evoked population activity in auditory cortex. *Neuron* 64: 404–418.
69. Aguilar JR, Castro-Alamancos MA (2005) Spatiotemporal gating of sensory inputs in thalamus during quiescent and activated states. *J Neurosci* 25: 10990–11002.
70. Urban J, Kossut M, Hess G (2002) Long-term depression and long-term potentiation in horizontal connections of the barrel cortex. *Eur J Neurosci* 16: 1772–1776.
71. Schubert D, Köster R, Staiger JF (2007) Mapping functional connectivity in barrel-related columns reveals layer- and cell type-specific microcircuits. *Brain Struct Funct* 212: 107–119.
72. Laaris N, Carlson GC, Keller A (2000) Thalamic-evoked synaptic interactions in barrel cortex revealed by optical imaging. *J Neurosci* 20: 1529–1537.
73. Lübke J, Feldmeyer D (2007) Excitatory signal flow and connectivity in a cortical column: focus on barrel cortex. *Brain Struct Funct* 212: 3–17.
74. Clarke K (1995) Differential fore- and hindpaw force transmission in the walking rat. *Physiol Behav* 58: 415–419.
75. Whishaw IQ, Travis SG, Koppe SW, Sacrey L-A, Gholamrezaei G, et al. (2010) Hand shaping in the rat: conserved release and collection vs. flexible manipulation in overground walking, ladder rung walking, cylinder exploration, and skilled reaching. *Behav Brain Res* 206: 21–31.
76. Woolf CJ, Wall PD (1982) Chronic peripheral nerve section diminishes the primary afferent A-fibre mediated inhibition of rat dorsal horn neurones. *Brain Res* 242: 77–85.
77. Lilja J, Endo T, Hofstetter C, Westman E, Young J, et al. (2006) Blood oxygenation level-dependent visualization of synaptic relay stations of sensory pathways along the neuroaxis in response to graded sensory stimulation of a limb. *J Neurosci* 26: 6330–6336.
78. Jain N, Florence SL, Kaas JH (1995) Limits on plasticity in somatosensory cortex of adult rats: hindlimb cortex is not reactivated after dorsal column section. *J Neurophysiol* 73: 1537–1546.
79. Endo T, Spenger C, Tominaga T, Brené S, Olson L (2007) Cortical sensory map rearrangement after spinal cord injury: fMRI responses linked to Nogo signalling. *Brain* 130: 2951–2961.
80. Yu X, Wang S, Chen D-Y, Dodd S, Goloshevsky A, et al. (2010) 3D mapping of somatosensory reorganization with small animal functional MRI. *Neuroimage* 49: 1667–1676.

VSD Imaging of the Paw Somatosensory Cortex

81. Weng JC, Chuang K-H, Goloshevsky A, Dodd SJ, Sharer K (2011) Mapping plasticity in the forepaw digit barrel subfield of rat brains using functional MRI. *Neuroimage* 54: 1122–1129.
82. Cliffer KD, Tonra JR, Carson SR, Radley HE, Cavnor C, Lindsay RM, Bodine SC, DiStefano PS (1998) Consistent repeated M- and H-Wave recording in the hind limb of rats. *Muscle Nerve* 21: 1405–1413.
83. Castro-Alamancos MA (2004) Dynamics of sensory thalamocortical synaptic networks during information processing states. *Prog Neurobiol* 74: 213–247.

